

UNTERSUCHUNGEN ZUR AUSSCHIEDUNGSDAUER
UND WIRKSAMKEIT NACH DEM TROCKENSTELLEN
VON KÜHEN MIT EINEM CLOXACILLIN-PRÄPARAT

CLAUDIA NEUMANN-PAULITSCHKE

Disbui. München

1987

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
(Lehrstuhl: Prof. Dr. G. Terplan)

**Untersuchungen zu Ausscheidungsdauer und Wirksamkeit
nach dem Trockenstellen von Kühen mit
einem Cloxacillin-Präparat**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Claudia Neumann-Paulitschke
aus
Wien

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. H. Zucker
Referent:	Prof. Dr. G. Terplan
Korreferent:	Prof. Dr. H. Kräußlich
Tag der Promotion:	24. Juli 1987

Herstellung: Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München

MEINEN ELTERN

1	1.1	1.1.1	1.1.2	1.1.3	1.1.4	1.1.5	1.1.6	1.1.7	1.1.8	1.1.9	1.1.10	1.1.11	1.1.12	1.1.13	1.1.14	1.1.15	1.1.16	1.1.17	1.1.18	1.1.19	1.1.20	1.1.21	1.1.22	1.1.23	1.1.24	1.1.25	1.1.26	1.1.27	1.1.28	1.1.29	1.1.30	1.1.31	1.1.32	1.1.33	1.1.34	1.1.35	1.1.36	1.1.37	1.1.38	1.1.39	1.1.40	1.1.41	1.1.42	1.1.43	1.1.44	1.1.45	1.1.46	1.1.47	1.1.48	1.1.49	1.1.50	1.1.51	1.1.52	1.1.53	1.1.54	1.1.55	1.1.56	1.1.57	1.1.58	1.1.59	1.1.60	1.1.61	1.1.62	1.1.63	1.1.64	1.1.65	1.1.66	1.1.67	1.1.68	1.1.69	1.1.70	1.1.71	1.1.72	1.1.73	1.1.74	1.1.75	1.1.76	1.1.77	1.1.78	1.1.79	1.1.80	1.1.81	1.1.82	1.1.83	1.1.84	1.1.85	1.1.86	1.1.87	1.1.88	1.1.89	1.1.90	1.1.91	1.1.92	1.1.93	1.1.94	1.1.95	1.1.96	1.1.97	1.1.98	1.1.99	1.1.100
---	-----	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	---------

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG	1
2 SCHRIFTTUM	2
2.1 Mastitisprophylaxe	2
2.1.1 Melktechnik	2
2.1.2 Melkhygiene und Zitzendesinfektion	4
2.1.3 Antibiotische Versorgung im Trockenstadium	6
2.2 Hemmstoffe in der Milch	11
2.2.1 Aus Arzneimittel-Verabreichungen stammende Hemmstoffe	11
2.2.2 Mit dem Futter aufgenommene Hemmstoffe	12
2.2.3 Endogen bedingte Hemmstoffe	13
2.2.4 Postsekretorisch in die Milch gelangte Hemmstoffe	17
3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN	19
3.1 Material	19
3.1.1 Versuchstiere	19
3.1.2 Trockensteller	19
3.2 Methodik	21
3.2.1 Versuchsablauf	21
3.2.2 Probenentnahme	21
3.2.3 Trockenstellen	22
3.2.4 Untersuchung auf Hemmstoffe	22
3.2.4.1 Agar-Diffusionstest	22
3.2.4.2 Brillantschwarz-Reduktionstest	24
3.2.5 Zytologische Untersuchungen	26
3.2.5.1 California-Mastitis-Test	26
3.2.5.2 Mikroskopische Untersuchung ("Kieler Sedimentausstrich-verfahren")	27
3.2.6 Bakteriologische Untersuchungen	27

		Seite
3.3	Ergebnisse	30
3.3.1	Übersicht über den Ablauf des Versuches	30
3.3.2	Untersuchung auf Hemmstoffe	31
3.3.2.1	Vor dem Trockenstellen	31
3.3.2.2	Nach dem Kalben	33
3.3.3	Untersuchung auf Eutergesundheit	35
3.3.3.1	Vor dem Trockenstellen	35
3.3.3.1.1	Zytologische Untersuchungen	35
3.3.3.1.2	Bakteriologische Untersuchungen	37
3.3.3.2	Nach dem Kalben	38
4	BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE UND DISKUSSION	42
5	ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	50
6	LITERATURVERZEICHNIS	52

1 EINLEITUNG

Ein wirksames Mastitisprophylaxeprogramm muß neben sorgfältiger Melkhygiene und sachgerechter Melktechnik, auch das Trockenstellen unter Antibiotikaschutz umfassen. Durch die Antibiotikaversorgung in der Laktationsruhe können Neuinfektionen des Euters verhindert und subklinische Mastitiden ausgeheilt werden. Oft verwendete Medikamente zum Trockenstellen sind insbesondere Isoxazoly-Penicilline, darunter das Cloxacillin.

Um die Abgabe antibiotikahaltiger Milch nach Anwendung von Trockenstellern zu vermeiden, sind für die Zeit nach dem Abkalben Wartezeiten festgelegt worden. In der letzten Zeit wurde jedoch vermehrt von Hemmstoffen in der Milch berichtet, insbesondere nach Anwendung eines oxacillinhaltigen Präparates, wobei trotz Beachtung der Wartezeit nach dem Trockenstellen Rückstände gefunden wurden. Um zu prüfen, ob diese verringerte Ausscheidung auch bei anderen Trockenstellern auftritt, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Cloxacillin-Präparat in Feldversuchen eingesetzt und die Milch nach dem Abkalben auf Antibiotikarückstände untersucht. Außerdem sollte die Wirksamkeit des Präparates bei bestehenden subklinischen Mastitiden geprüft werden.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Mastitisprophylaxe

Mastitisprophylaxe wird zweckmäßig als Programm durchgeführt, in dem die sachgerechte Melktechnik, die Beachtung der Melkhygiene einschließlich der Zit-zendesinfektion nach dem Melken und die antibiotische Versorgung des Euters in der Laktationsruhe als wichtigste Punkte zu nennen sind. Außerdem gehören die Mastitistherapie bei laktierenden Tieren, das Ausmerzen therapieresistenter Kühe und die Eutergesundheitskontrolle dazu, worauf aber in diesem Rahmen nicht näher eingegangen wird.

2.1.1 Melktechnik

Mastitiden verursachen große wirtschaftliche Verluste. POSTLE und NATZKE (1974) geben den Schaden mit mehr als 100 \$ pro Tier jährlich an. TERPLAN und GROVE (1977) bezeichnen die wirtschaftlichen Verluste in der BRD allein durch den Leistungsrückgang infolge subklinischer Mastitiden ohne die Behandlung klinischer Erkrankungen zwischen 370 bis 450 Mio. DM. NEUMANN be-zif- fert 1983 die finanziellen Einbußen ebenso wie schon HAMANN 1975 mit rund 500 Mio. DM jährlich. Nach REICHMUTH et al. (1970) beträgt der Leistungs- abfall bei einer Mastitis oder Sekretionsstörung 5,1 %. Die Milchleistung erkrank- ter Euterviertel verminderte sich mit Zunahme des Zellgehaltes bei Überschrei- tung des zytologischen Grenzwertes von 500 000 Zellen pro ml Milch im An- fangsgemelk um durchschnittlich 17,1 %.

FRANK (1981) behauptet, daß chronische Euterentzündungen, die zu 95 % sub- klinisch verlaufen, als hauptsächliches Bestandsproblem gelten. Wegbereiter für chronische Mastitiden sind in erster Linie mechanische Schadfaktoren durch Feh- ler in der Melktechnik, Blindmelken und zu lange Melkdauer. WIESNER und GOMEZ (1979) weisen auf die wichtige Rolle einer einwandfreien Funktion der Melkanlage und deren sachkundige Bedienung in einem Mastitisprophylaxepro- gramm hin. Die wichtigsten Fehlerquellen werden von TERPLAN und WIESNER (1969) in zu hohem, zu niedrigem oder schwankendem Vakuum, in der falschen Pulsartortaktzahl und in zu alten bzw. in der Größe nicht passenden Sitzengum- mis angegeben. Nach FRANK (1981) gehören zu den häufigsten Fehlern beim Ma-

schinenmelken eine zu geringe Förderleistung der Vakuumpumpe und Blindmelken. Diese Fehler verursachen unterschiedliche mechanische Beanspruchungen insbesondere der Zitze vom Strichkanal bis zur Drüsenzisterne. Kommen zu den mechanisch bedingten Schäden Mastitiserreger hinzu, sind Voraussetzungen für eine Mastitisentstehung gegeben.

TOLLE et al. (1977) prüften, ob Beziehungen zwischen der Mastitishäufigkeit und der Technik des maschinellen Milchentzuges bestehen. Sie untersuchten folgende Parameter: Pulsfrequenz, Pulsverhältnis, Vakuum, Pumpenkapazität, Regelventil, Sammelstückvolumen und Rückflußwahrscheinlichkeit. Bei Unter- oder Überschreitung von 40 - 60 Doppeltakten pro Minute war die Zellzahl in der Milch erhöht. Mit zunehmender Länge der Saugphase nahm der Prozentsatz der kranken Tiere geringgradig ab. Eine Erhöhung der Pumpenkapazität wirkte sich günstig auf die Zellzahl aus, ebenso war eine höhere Genauigkeit des Regelventils von günstigem Einfluß. Beim Sammelstück zeigte sich eine deutliche umgekehrte Beziehung zwischen dem Erkrankungsgrad bzw. der Erkrankungshäufigkeit und der Volumengröße des Sammelstücks und somit der Rückflußwahrscheinlichkeit, bei deren Zunahme es zu einer Häufung von Mastitiden kommt. HAMANN (1980) stellt drei Prinzipien für die Übertragung von Mastitiserregern heraus: a) Übertragung zwischen den Kühen durch kontaminierte Melkzeuge; b) Übertragung zwischen den Kühen durch Rückfluß aus der Melkanlage; c) Übertragung innerhalb einer Kuh von Viertel zu Viertel durch Rückfluß und Rückspray. Als Maßnahmen gegen eine Kontamination der Kühe durch die Melkzeuge schlägt er eine Zwischendesinfektion mit 200 ppm Aktivchlor oder 50 ppm Jodlösung vor, gegen den Rückflußeffect könnte ein großvolumiges Sammelstück eingesetzt werden, und um das Infektionsrisiko des Rücksprays möglichst gering zu halten, sollten sämtliche Anlagen mindestens ein- bzw. zweimal pro Jahr kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert werden.

Nicht nur fehlerhafte Melkmaschinen, sondern auch falsche Handhabung der Melkmaschinen können zu einem Anstieg von Euterentzündungen führen. Richtiges Melken setzt sich aus Vormelken, Anrüsten, Ansetzen der Melkbecher und Nachmelken zusammen (TERPLAN und WIESNER, 1969). Dieses Management wird auch von TOLLE und WHITTLESTONE (1976) beschrieben. Versuche von WALSER (1966) zeigten, daß Verzicht auf das Anrüsten bei Erstlingskühen eine Erhöhung des Zellgehaltes in der Milch zur Folge hatte. Weglassen des Nachmel-



kens bei maschinellem Milchentzug führte bei älteren Tieren zu einer zum Teil starken Zellzahlerhöhung, während die Milch von Erstlingskühen unverändert war. Auch durch Blindmelken kam es zu einem Zellanstieg. Bei histologischen Untersuchungen des Eutergewebes wurden Epithelabschilferungen im Strichkanal und interstitielle Ödeme nachgewiesen. EBENDORFF et al. (1985) untersuchten drei Laktationen hindurch Kühe, bei denen nur die Hälfte der Euterviertel nachgemolken wurden. Mit zunehmender Laktationszahl stieg die Zahl der Eutererkrankungen bei den nicht ausgemolkenen Vierteln deutlich an, die Milch- und MilCHFetterträge verringerten sich.

2.1.2 Melkhygiene und Zitzendesinfektion

Die Melkhygiene verfolgt im wesentlichen die Aufgaben, eine hygienisch-bakteriologisch gute Milch zu gewinnen und dem Entstehen von Euterinfektionen vorzubeugen. Sie umfaßt daher alle Tätigkeiten und Maßnahmen in Verbindung mit dem Melken, die diesem Ziel gerecht werden. Dazu gehören u.a. sachgerechte Melkvorbereitung, Maßnahmen nach dem Melken wie die Zitzendesinfektion und die Reinigung und Desinfektion der Melkanlagen, ebenso wie richtiges hygienisches Verhalten des Melkpersonals.

Die Keimübertragung zwischen den Tieren läßt sich zwar nicht völlig ausschalten, aber durch hygienische Maßnahmen zumindest weitgehend verhindern (NEAVE et al., 1969). Da Zahl und Art der Bakterien auf der Zitzenhaut in Relation zu den Infektionen der Drüse stehen (PANKEY et al., 1984), müssen die Zitzen zum Melken sauber und, um Schmierinfektionen zu vermeiden, auch trocken sein. Deshalb sollten auch Euter und Zitzen, sofern naß gereinigt wird, mit einem Einmalhandtuch abgetrocknet werden (GALTON et al., 1984). Die Desinfektion des Euters vor dem Melken hat sich in der Vergangenheit nicht bewährt. Frühere Erfahrungen werden durch TOLLE und WHITTLESTONE (1976) bestätigt, die Euterreinigungen mit hexachlorphenhaltiger Seife an Zwillingskühen vornahmen. Das Hautfett wurde durch die Waschungen stark reduziert. Die Folge war Austrocknung mit Rissen und Schrunden, die gute Voraussetzungen für Infektionen bieten. Die Autoren plädieren daher für eine trockene Säuberung und empfehlen nur bei grober Verschmutzung eine Waschung mit fließendem Wasser mit anschließender Abtrocknung durch ein Einmalhandtuch.

Neben der Reinigung des Euters und der Zitzen ist auch persönliche Hygiene des Melkpersonals erforderlich, da die Übertragung von Erregern durch unsaubere Melkerhände möglich ist (TOLLE, 1983). NEAVE et al. beschreiben 1962 die manuelle Übertragung von *S. aureus* auf das Euter.

Die Reinigung des Melkgeschirrs und der Melkanlage ist eine weitere unumgängliche Maßnahme, auf die jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen werden soll.

Eine Erhöhung der Euterinfektionen wird durch schlechte stallhygienische Verhältnisse mitbestimmt (SCHMAHLSTIEG, 1960). KALICH stellte 1958 eine positive Korrelation zwischen dem Auftreten von Coli-Mastitiden und unhygienischen Stallverhältnissen (dunkel, naß, unsauber, schlecht belüftet) fest. Untersuchungen von BAKKEN (1985) in Skandinavien ergaben, daß hinsichtlich des Vorkommens von Mastitiden zwischen den verschiedenen Haltungsformen Unterschiede bestehen. Die höchsten Erkrankungsraten traten in Anbindehaltung auf. Für Unterschiede hinsichtlich der Infektionsraten zwischen einzelnen Herden in dieser Haltungsform machte er Länge, Breite und Standfläche des Standplatzes, Art und Menge der Einstreu, Anbindesystem, Krippenkonstruktion, Vorhandensein von Kuhtrainern und die Dungbehandlung verantwortlich.

Eine wesentliche Maßnahme der Mastitisprophylaxe ist die Zitzendesinfektion nach dem Melken, auch Zitzentauchen oder "Dippen" genannt, bei dem die Zitzen zu einem Drittel in eine Desinfektionsmittellösung getaucht werden, die außerdem einen hautpflegenden Stoff oder ein Rückfettungsmittel enthält. Ziel dieser Maßnahme ist die Entfernung euterpathogener Mikroorganismen, die durch den Melkvorgang über die beschriebenen Wirkungsmechanismen (S. 3) auf die Zitzenhaut gelangt sind. Keime könnten ansonsten in der Zwischenmelkzeit durch den Strichkanal in das Euter einwandern. In der Natur schützt offensichtlich der antibakteriell wirkende Speichel des saugenden Kalbes vor dieser Infektion (TOLLE und WHITTLESTONE, 1976). WIESNER und GOMEZ (1979) beschreiben die Ziele der Zitzendesinfektion folgendermaßen:

- a) Entfernung von Milchresten, die Mikroorganismen eine Vermehrungschance geben,
- b) Inaktivierung pathogener Keime und
- c) Schutz der Haut vor bakterieller Besiedelung in den Zwischenmelkzeiten.

TERPLAN und GROVE (1977) unterscheiden zwischen direkter und indirekter extramammärer Erregerabwehr, wobei zu ersterer das Zitzentauchen neben der prophylaktischen Antibiotikaaanwendung in der Trockenperiode gezählt wird. Sie weisen außerdem darauf hin, daß auch Keime in dem unteren Teil des Strichkanals und in Erosionen an den Zitzenkuppen durch das "Dippen" beseitigt werden, ohne allerdings intramammäre Infektionen beeinflussen zu können. PANKEY et al. (1984) bezeichnen das "Dippen" als leichte, effektive und ökonomisch günstige Methode, um die Bakterienflora der Zitzenhaut zu verringern. Sie nennen Jodophore, Benzylalkohol, quarternäre Ammoniumverbindungen, Chlorhexidin, Natriumhypochlorit, "acryl latex" und Dodecyl-Benzolsulfonsäure, die von verschiedenen Autoren untersucht worden sind, und fassen zusammen, daß das Zitzentauchen viele Neuinfektionen des Euters verhindern kann, wenn es im Rahmen eines Mastitisprophylaxeprogramms angewandt wird.

2.1.3 Antibiotische Versorgung im Trockenstadium

Da während der Laktationsruhe das Euter für Infektionen besonders anfällig ist - 30 % aller Neuinfektionen treten in diesem Zeitraum auf -, ist die Verabreichung eines Antibiotikums beim Trockenstellen sowohl zum Schutz gegen Neuinfektionen und auch zur Ausheilung bestehender subklinischer Infektionen von großer Bedeutung (TOLLE, 1983). FRANK und POUNDEN (1961) sowie PROBST und BEHRINGER (1968) sprechen sogar von über 50 % der Infektionen, die in der Trockenperiode neu entstehen. Die Infektionsrate ist während des Trockenstadiums besonders kurz vor der Geburt am höchsten (SMITH et al., 1985b).

AEHNELT und KRAUSE (1955) und GRUNERT und WEIGT (1964) weisen auf die Besiedelung des Euters mit coliformen Keimen vor allem zur Zeit der Geburt und im Puerperium hin. SMITH et al. (1985b) haben besonders häufig in der ersten Hälfte der Trockenperiode coliforme Keime isoliert, wobei *E. coli* vermehrt in der zweiten Hälfte der Trockenphase zu finden war. Die Keime persistierten während des Trockenstehens bis hin zur nächsten Laktation.

Die antibiotische Behandlung von subklinischen Mastitiden ist während der Trockenperiode effektiver als während der Laktation (PHILPOT, 1969; DODD et al., 1977; TOLLE, 1983). MACMILLAN et al. (1983) betonen, daß es durch die Trok-

kenzeittherapie zu weniger klinischen Eutererkrankungen in den ersten zwei Monaten der folgenden Laktation kommt, bei unbehandelten Tieren seien außerdem die Milchleistung geringer und der Zellgehalt der Milch höher als bei mit Antibiotika trockengestellten Kühen. CHRISTIE et al. (1974) weisen ebenfalls darauf hin, daß die Antibiotikaversorgung von allen vier Vierteln während der Trockenperiode die effektivste und ökonomisch beste Lösung zur Kontrolle von chronischen Mastitiden ist. WEIGT (1974) zählt folgende Vorzüge des Trockenstellers auf: hohe Antibiotikaanfangskonzentration, wochenlanger therapeutischer Spiegel, prophylaktischer Schutz gegen Neuinfektionen, nur einmalige Behandlung, kein Milchverlust und keine durch Antibiotika bedingte Schäden bei der Verarbeitung der Milch. BRUMMER (1969) vermutet als weiteren Vorteil, die bessere Heilungstendenz des ruhiggestellten Euters, da die mechanische Beanspruchung beim Melken wegfällt. Nach HIRSCH (1983, 1985) kann in galtfreien Betrieben auf Trockensteller verzichtet werden, da die Selbstheilungsrate 70 % bei infizierten Eutern ohne Sekretionsstörung und 55,6 % bei Euterinfektionen mit Sekretionsstörung betrage. Auch nach Untersuchungen von POSTLE und NATZKE (1974) kam es zu einer gewissen Selbstheilung der infizierten Milchdrüse, allerdings lag diese Quote weiter unter derjenigen, die bei Verwendung von Trockenstellern festgestellt wurde.

Durch die antibiotische Versorgung des trockenstehenden Euters wurde die Heilungsquote von chronisch-latenten Mastitiden von etwa 60 auf 87 % erhöht (WEIGT, 1974). WALSER et al. (1973) stellten bei ihren Versuchen mit Trockenstellern einen Therapieerfolg von 73,1 % bei subklinischen Mastitiden fest. Nach SMITH et al. (1985a) wird durch die Trockenzeittherapie die Streptokokkeninfektionsrate in der frühen Phase der Laktationsruhe reduziert. Bei coliformen Keimen blieb die Behandlung ohne Effekt. Bei einem vergleichenden Versuch von FUNK et al. (1982) zwischen nichtbehandelten und medikamentell trockengestellten Tieren wurden mehr Staphylokokken- und Streptokokkeninfektionen bei den unbehandelten Kühen festgestellt. Zusätzliche Zitzendesinfektion nach dem Melken ("Dip-pen") erhöhte den Erfolg des Trockenstellers. Nach NATZKE et al. (1972) wirken sich allgemein hygienische Maßnahmen beim Melken gemeinsam mit der Trockenzeittherapie in einer Steigerung der Milchproduktion und in einer Reduzierung der Infektionsrate von 28,1 auf 7,1 % aus. Versuche von PEARSON (1950) in Nordirland an trockenstehenden Kühen zeigten, daß Trockensteller mit Penicillin und Calcium-Penicillin in öliger Basis mit und ohne Aluminiummono-

stearat das Euter zu 50-70 % vor einer Besiedelung mit *C. pyogenes* schützen konnten. Auch EDWARDS und SMITH (1967) und EVANS et al. (1972) fanden bei Verwendung eines penicillinhaltigen Trockenstellers eine 71-85%ige Verminderung von *C. pyogenes*-Infektionen. EDWARDS und SMITH (1967) stellten jedoch keinen Effekt auf Streptokokken und Staphylokokken fest, im Gegensatz zu EVANS et al. (1972), die Penicillin-Dihydrostreptomycin verwendeten und bei Streptokokkeninfektionen eine etwa 90%ige und bei Koagulase-positiven Staphylokokken eine 78%ige Verminderung erzielten. JACOBS et al. (1972) testeten Procain-Penicillin-Nitrofurazon und Procain-Penicillin mit Neomycin. Beide Mittel waren gut wirksam gegen Streptokokken, Procain-Penicillin mit Neomycin verringerte darüber hinaus auch die Anzahl der Staphylokokken. UVAROV et al. (1967) untersuchten ein Kombinationspräparat von Penicillin und Novobiocin in Aluminiummonostearat. Die Euterinfektionsraten waren am 4. Tag post partum (p.p.) gegenüber den vor dem Trockenstellen vorhandenen Infektionen reduziert. Penicillin wirkt dabei bakterizid auf proliferierende Keime und bakteriostatisch auf ruhende Mikroorganismen. Bei lange anhaltender Bakteriostase ist jedoch mit einer irreversiblen Schädigung der Keime zu rechnen. SCHULTZE (1983) berichtet von guten Erfolgen bei Verwendung von Procain-Penicillin kombiniert mit Dihydrostreptomycin, allerdings nur zu Beginn der Trockenperiode. Nach der Trockenzeitbehandlung erwiesen sich jedoch einige Stämme als resistent, die zuvor gegen Penicillin und Streptomycin empfindlich gewesen waren. SCHMID et al. (1973) empfehlen, Benzathinsalze des Cloxacillins oder Oxacillins zu verwenden, da sie bei diesen Antibiotika einen wirksamen Spiegel von mindestens drei Wochen festgestellt haben. BRUMMER (1969) konnte bei mindestens 80 % seiner Versuchstiere einen therapeutischen Spiegel von Cloxacillin über einen Zeitraum von zwei Wochen feststellen. Bei einem Vergleich zwischen Cloxacillin und Procain-Penicillin kam es bei ersterem zu einer 60%igen, bei letzterem zu einer 38%igen Eliminierung von Staphylokokken-Infektionen (PEARSON und WRIGHT, 1969). In Untersuchungen von BRANDNER et al. (1964) zeigten sich 48 % der aus Eutern isolierten Staphylokokkenstämme gegenüber Penicillin resistent, während Cloxacillin bei allen Stämmen wirksam war. DITTUS et al. (1972) bestätigten diese Aussage in einem Versuch, in dem sie verschiedene Antibiotika testeten: Cloxacillin und Kanamycin waren gegenüber getesteten Staphylokokkenstämmen wirksam, während die meisten gegen Penicillin-G, Streptomycin und Tetracyclin Resistenz zeigten. Geringe Resistenzquoten waren allerdings auch bei Streptokokken gegenüber Cloxacillin zu finden.

Benzathin-Cloxacillin wurde von verschiedenen Autoren untersucht. DANNEMANN (1973) z.B. führte Untersuchungen an Tieren durch, die mit Benzathin-Cloxacillin und Benzathin-Oxacillin trockengestellt worden waren, und fand zwei Wochen p.p. einen geringeren Zellgehalt als in der Milch der späten Laktation vor. Bakteriologisch zeigte sich eine Verringerung der Infektionsrate bis zwei Wochen p.p. WRIGHT und LEAVER (1984) verglichen mit Cloxacillin trockengestellte Tiere mit unbehandelten Kühen und stellten weniger Infektionen bei den medikamentell trockengestellten Kühen zum Geburtstermin und sogar bis zu zwei Wochen p.p. fest. Nach Untersuchungen von KEEFE (1980) beträgt die Effektivität von Cloxacillin bei der Eliminierung bestehender Streptokokken- und S.aureus-Infektionen 94,6 und 80,9 %. In der Zeit des Abkalbens kam es zu einer Verminderung der Streptokokken-Infektionen um 87,2 und S.aureus-Infektionen um 54,8 %, coliforme Keime wurden allerdings nur minimal beeinflusst. Diese Aussage deckt sich mit der von SMITH et al. (1985a). Auch andere Autoren sprechen von guten Erfolgen bei Infektionen mit S.aureus, Sc.agalactiae und anderen Streptokokken (DAVIS et al., 1975). Ebenso wie MALHOTRA et al. (1984), bei deren Versuchen 83-100 % der Staphylokokken- und Streptokokken-Infektionen mit Benzathin-Cloxacillin auskuriert werden konnten, berichten CHRISTIE et al. (1974) von infizierten Eutervierteln, bei denen die Staphylokokken- und Streptokokken-Infektionen insgesamt zu 82 % eliminiert wurden. Der Trockensteller zeigte allerdings eine bessere Wirkung bei den Streptokokken-infizierten Vierteln. MERCK und RAACK (1972) testeten ebenso wie HILL und KEEFE (1974) die Wirksamkeit von Benzathin-Cloxacillin. Die Infektionsrate der behandelten Tiere war im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe um etwa 40 % niedriger. Bei MERCK und RAACK (1972) kam es zu einem Abfall der bakteriologisch-positiven Viertel von 22,7 auf 14,5 %, während bei den Kontrolltieren ein Anstieg zu verzeichnen war. Die Zahl der klinischen Mastitiden war bei den unbehandelten Kühen gegenüber den medikamentell trockengestellten leicht erhöht. In der behandelten Gruppe konnten nach dem Abkalben etwa 50 % weniger subklinische Erkrankungen registriert werden als vor dem Trockenstellen. MERCK und DANNEMANN (1977) stellten bei Verwendung von Benzathin-Cloxacillin um etwa 50 % weniger klinische Mastitiden und auch eine um 27,3 % höhere Heilungsrate als in der unbehandelten Kontrollgruppe fest. Untersuchungen von Cloxacillin in Kombinationspräparaten, mit Erythromycin (CLEGG et al., 1975) und mit Ampicillin (POUTREL et al., 1984), zeigten ebenfalls gute Ergebnisse. Bei letzteren verglich man die Eutergesundheit von einmal oder zweimal in einer Trockenperio-

de behandelten Tiere. Die Neuinfektionsrate war bei zweimaliger Behandlung geringer, aber die Erfolge in bezug auf die Eliminierung vorher bestehender Infektionen waren gleich. EDMONDS (1979) verglich zwei Gruppen, die entweder einmal oder zwei- bis dreimal mit einem Cloxacillin-Ampicillin-Präparat in der Trockenperiode behandelt wurden. Bei der zweiten Gruppe waren 50 % weniger "Sommermastitiden" (*C. pyogenes*) zu bemerken. Vergleiche zwischen Benzathin-Cloxacillin und anderen Präparaten wurden ebenfalls durchgeführt. Benzathin-Cloxacillin (500 mg) zeigte sich, verglichen mit einem Kombinationspräparat mit Novobiocin (250 mg) und Penicillin (300 000 I.U.) und einem Spiramycin-haltigen Trockensteller, am effektivsten (LOOSMOE et al., 1968). Die Neuinfektionsrate lag bei Verwendung von Cloxacillin bei Staphylokokken-Infektionen bei nur noch 2,8 %, bei Streptokokken-Infektionen war sie praktisch zu vernachlässigen. Auch bei LANGLEY et al. (1971) zeigte Cloxacillin bessere Heilungserfolge als die Kombinationspräparate von Penicillin und Novobiocin. Mehr als 90 % der Streptokokken- und alle *Scagalactiae*-Erkrankungen wurden durch Cloxacillin geheilt. STEFFAN et al. (1984) hatten hingegen kaum Unterschiede zwischen ihren drei Präparaten feststellen können (Cloxacillin; Novobiocin und Novobiocin mit Penicillin). Bei allen Antibiotika wurden 78-93 % der *S. aureus*-Infektionen und 80-100 % der Streptokokken-Infektionen ausgeheilt.

SMITH et al. (1967) untersuchten drei Versuchsgruppen, eine ohne Trockenstellerbehandlung und "Dippen", die zweite mit Trockensteller (200 mg Cloxacillin) und "Dippen" und die dritte mit 1,0 g Cloxacillin und "Dippen". Bei den Versuchsgruppen mit Trockenstellern und "Dippen" fiel die Infektionsrate von 60 auf 50 % ab. Bei Verwendung der höheren Cloxacillin-Konzentration traten weniger subklinische Infektionen zum Zeitpunkt der Kalbung auf. BRANDER et al. (1975) untersuchten drei Jahre lang den Erfolg einer Trockenzeittherapie mit Benzathin-Cloxacillin verbunden mit "Dippen" und Überwachung der Melkmaschine. Alle drei Faktoren gemeinsam brachten im Vergleich mit einer Kontrollgruppe erhebliche Vorteile, die sich in einer Senkung der klinischen Erkrankungen, in einer höheren Milchmenge pro Tier und in einer Verbesserung der Milchqualität auswirkte. SEELEMANN et al. (1962) und TOLLE et al. (1977) weisen darauf hin, daß Mastitisprophylaxe als Programm verstanden werden muß. MERCK et al (1977) betonen, daß sich nur im Rahmen eines Mastitisprophylaxeprogrammes, in dem Melktechnik und Melkhygiene aufgenommen waren, auf lange Sicht sich ein Erfolg zeigte.

Auf die verschiedenen Möglichkeiten der Vehikel der Trockenstellpräparate, die die Wirkungsdauer des Medikaments entscheidend beeinflussen, soll in dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden, da sie in der Dissertation von FEUERSTEIN (1987) besprochen wurden.

2.2 Hemmstoffe in der Milch

Das Auftreten von Hemmstoffen in der Milch kann einerseits durch aktiv oder passiv vom Organismus aufgenommene, andererseits durch vom Körper selbst gebildete Substanzen bedingt sein. Zu der ersten Gruppe gehören Arzneimittel, Futtermittel und Insektizide. Bei den körpereigenen Hemmstoffen kommen Hormone, Immunglobuline, Fermente oder Leukozyten in Frage. Auch eine postsekretorische Kontamination der Milch mit Hemmstoffen ist möglich. Es können Reinigungs-, Desinfektions- und Konservierungsmittel o.ä. in die Milch gelangen. Im weiteren Sinne sind auch Bakteriophagen den Hemmstoffen zuzuordnen (TERPLAN und ZAADHOF, 1967).

2.2.1 Aus Arzneimittelverabreichungen stammende Hemmstoffe

Der größte Anteil dieser Hemmstoffe ist den Antibiotika zuzuordnen, auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll, da sie kürzlich an diesem Institut von FEUERSTEIN (1987) beschrieben wurden.

Sulfonamide wurden von OBIGER (1970) und KRAACK und REICHMUTH (1971) im Brillantschwarz-Reduktionstest untersucht. Bei OBIGER konnten fünf Präparate in einer Konzentration von 1 mg/ml Milch einen Hemmeffekt ausüben. Bei 0,1 mg/ml Milch wurde die Reaktion negativ oder zweifelhaft. Auch bei KRAACK und REICHMUTH (1971) kam es erst bei hohen Konzentrationen der Sulfonamide und Sulfone in der Milch zu einer Beeinflussung des BRT. GUDDING konnte 1976 erstmals die Testempfindlichkeit für Sulfonamide durch Trimethoprimzugabe erhöhen. Nach intramuskulärer und intravenöser Verabreichung prüften NOUWS et al. (1985) Sulfadimidin und ihre Metaboliten in Plasma und Milch. Sie stellten fest, daß die Konzentrationen von Sulfadimidin und Metaboliten in der Milch während des gesamten Versuchs, bei zweimaligem Melken täglich, nie über 2 % der applizierten Dosis lagen. Wegen der geringen Empfindlichkeit der Milchsäurebakterien spielen die Sulfonamide als Ursache für Fehlsäuerung in den Molkezeiten keine große Rolle (OBIGER, 1970; KRAACK und REICHMUTH, 1971).

2.2.2 Mit dem Futter aufgenommene Hemmstoffe

Alimentär aufgenommene Hemmstoffe können aus den Futterpflanzen oder aus Futterzusätzen stammen. 1966 stellte KLIMA nach Beginn der Grünfütterung im Frühjahr bei Untersuchungen von Rinder- und Kälberfleisch im Agar-Diffusionstest kleinste Hemmhöfe fest. Reiner Pflanzensaft von Kapuzinerkresse hemmte in einem Versuch von WELZ (1967) das Wachstum von *B.subtilis*, was sich in Hemmzonen von mindestens 3 mm darstellte. Bei Fleischuntersuchungen von mit Kapuzinerkresse gefütterten Meerschweinchen wurde dies allerdings nicht bestätigt. Bekannt als mögliche Hemmstoffe in der Milch sind auch Senfölglykoside, die z.B. im Grünraps vorkommen. Diese Pflanzen werden mit der Säuerungsträgheit der Milch zu bestimmten Jahreszeiten in Zusammenhang gebracht (LIMMER, 1969; TERPLAN, 1969). Auch Rübsen, Knoblauch, sowie die oben genannte Kresse werden als Ursache für eine ungenügende Säuerung der Milch in Betracht gezogen (TERPLAN, 1969; ZEITRÄG, 1970). Bei Fütterungsversuchen von ZEITRÄG fiel bei Steckrübenblattsilage und Schlempefütterung eine verringerte Säuerungsfähigkeit auf. Bei der Schlempefütterung sogar nach Erhitzen (60 °C) der Milch. Auch die Umstellung von Stall- auf Grünfutter setzte das Säuerungsvermögen kurzfristig herab; anschließend nahm es aber wieder erheblich zu. Nach TERPLAN (1969) wirkt sich der Übergang zu Grünfutter im Frühjahr fördernd auf das Wachstum von Joghurtkulturen in der Milch aus, während beim Wechsel von Grünfutter auf Winterfütterung eine negative Beeinflussung zu beobachten war. Zu eben solchen Ergebnissen kam auch FRANK im gleichen Jahr. Die Beobachtung, daß nach Feiertagen vermehrt säuerungsträge Milch auftritt, könnte nach KELLERMANN und WAUSCHKUHN (1968) unter Umständen auch auf unsachgemäße Fütterung oder auf, die auch schon von LIMMER (1969) genannten, ungünstigen Bedingungen beim Melken zurückzuführen sein.

Außer den in Pflanzen selbst vorkommenden Hemmstoffen gibt LIMMER (1969) als mögliche Ursache für säuerungsträge Milch auch stark verschimmelteres Grünfutter oder Heu an.

Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel müßten in Konzentrationen von mehr als 0,15 % in der Milch vorkommen, um im BRT eine Reaktion auszulösen (OBIGER, 1970). Da diese Konzentrationen nie erreicht werden, sind sie als Hemmstoffe in der Milch ohne Bedeutung.

2.2.3 Endogen bedingte Hemmstoffe

Das Vorkommen von keimhemmenden Substanzen in der Milch, die durch den Körper selbst gebildet werden, wird von mehreren Autoren beschrieben (REITER und ORAM, 1967; KELLERMANN und WAUSCHKUHN, 1968; REITER, 1978 a,b; NONNECKE und SMITH 1984 a,b; SENFT et al., 1984). Nach REITER (1978a) können diese Stoffe in solche mit spezifischer und unspezifischer antimikrobieller Wirkung eingeteilt werden. Spezifisch wirken Immunglobuline und Komplement, polymorphkernige Leukozyten (PMN) und Makrophagen. Zur unspezifischen Keimhemmung kommt es durch das antimikrobiell wirkende Lysozym, das Laktoferrin und das Laktoperoxidase/Thiozyanat/Wasserstoffperoxid-System. Außerdem nennt REITER noch Properdin, das allerdings in nur geringer Menge in der Milch vorkommt, das im Kolostrum zu findende Konglutinin sowie die Bakterienwuchsstoffe Vit B₁₂ und Folsäure bindende Proteine.

Immunglobuline und Komplement

Der Gehalt an Immunglobulinen in der Milch wie auch der anderer Milchbestandteile unterliegt ständigen Veränderungen. Nach KIELWEIN (1985) sowie SCHANBACHER und SMITH (1975) kommt es zu einer beträchtlichen Erhöhung der Immunglobuline in der Kolostralmilch. Aber auch im Trockensekret sind sie um ein Vielfaches höher als in "Normalmilch", wobei die Werte von IgG₂, IgA und IgM in etwa denen des Kolostrums gleich sind. Eine Ausnahme bildet nur IgG₁, das im Kolostrum eine viel höhere Konzentration aufweist als im Trockensekret. NONNECKE und SMITH (1984a) verglichen Milch in der späten Laktation, in der frühen Involution des Euters und bei der Geburt bzw. in der frühen Laktation. Sie fanden die IgG-Konzentration am höchsten in der frühen Involution.

IgA wird in der Milchdrüse der Kuh nur wenig gebildet, im Unterschied zur Frauenmilch, deren Gehalt sehr hoch ist (KIELWEIN, 1985). Es spielt vor allem bei Darminfektionen des Neugeborenen eine Rolle (REITER, 1978a).

Laktoferrin

Laktoferrin (LF), ein Eisen-Chelat-Protein, kommt im Zytoplasma von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten vor (HARMON und NEWBOULD, 1980). Ein Anstieg der Zellen in Mastitismilch ist also auch gleichzeitig mit einer Erhöhung

des LF-Gehaltes verbunden (SCHANBACHER und SMITH, 1975). LF ist hitzestabil (bei 90 °C 60 Minuten) und läßt sich durch Trypsin inaktivieren (REITER und ORAM, 1967).

Die LF-Konzentration ist am höchsten bei der in der Involution befindlichen Drüse (SMITH et al., 1971; SCHANBACHER und SMITH, 1975; NONNECKE und SMITH, 1984 a,b), während die Konzentration in "normaler" Milch zwischen 0,1 und 0,3 mg/ml liegt (NONNECKE und SMITH, 1984b). Vom zweiten bis vierten Tag nach Beginn der Trockenperiode, an denen die Konzentration 1,15 mg/ml beträgt, steigt der Gehalt von LF linear bis zu einem Maximum nach drei bis vier Wochen auf etwa 20 mg/ml (WELTY et al., 1976). Nach SMITH et al. (1985c) nimmt LF sogar um das 100fache während der Involution zu, reduziert sich aber gegen Ende der Laktationsruhe. Das Kolostrum enthält nach REITER (1978a) 6 mg/ml LF. Nach der Kolostralphase fällt die LF-Konzentration.

Während der Involution wird Citrat aus der Milchdrüse rückresorbiert und Bikarbonat tritt aus dem Blut in die Milch über (REITER, 1978a). Dadurch entsteht die Voraussetzung für eine maximale Wirkung des LF, die bei einem pH-Wert von 7,4 liegt. Nach BATISH et al. (1984) ist LF bei einem pH-Wert von 6,8, nach LAW und REITER (1977) bei einem Wert von 6,0 inaktiv.

Das Wachstum coliformer Keime in der Milch nahm in einem Versuch von SMITH et al. (1985c) um das 10- bis 100.000fache in dem Maße ab, in dem die Involution erfolgte. Bei experimenteller E.coli-Infusion, die beim laktierenden Euter schwere Mastitiden hervorruft, kam es in der trockenstehenden Drüse zu keiner Erkrankung (REITER, 1978a). SMITH et al. (1985c) untersuchten Milchsekrete, die vor dem Trockenstellen, in der Trockenperiode, zum Zeitpunkt des Kalbens oder während der Laktation gewonnen wurden, in vitro auf deren Einfluß auf coliforme Keime und Streptokokkenstämme. Die Wachstumshemmung stand in deutlicher Korrelation zum erhöhten LF-Gehalt bzw. zur abnehmenden Citratmenge in der Milch. Gegen Ende der Trockenzeit verringerte sich die hemmende Wirkung der Sekrete auf coliforme Keime. Da es kurz vor der Geburt nach REITER (1978a) zu einer Citratzufuhr aus dem Blut kommt und Bikarbonat resorbiert wird, ist die bakteriostatische Wirkung des LF zu diesem Zeitpunkt gering und Mastitiden werden begünstigt. Durch Absättigung von LF mit Eisen wird dessen keimhemmende Wirkung aufgehoben (REITER, 1978b; NONNECKE und SMITH, 1984b). Bei in vitro-Versuchen mit coliformen Keimen von NONNECKE

und SMITH (1984b) kam es bei Zugabe von Bikarbonat zu einer verstärkten, durch Citratzugabe zu einer Reduktion der Keimhemmung. In einer Untersuchung von BATISH et al. (1984) mit Büffelmilch zeigte LF in vitro keinen Einfluß auf das Wachstum von Staphylokokken bis zu einer Konzentration von 0,01 mg/ml. Erst zwischen 0,02 und 2 mg/ml kam es zur Wachstumshemmung, die bei einer Konzentration von 0,2 mg/ml bis zu 90 % betrug. Bei Zugabe von 0,5 mM Eisensulfat wurde die LF-Wirkung zu 50 % wieder aufgehoben und ging bei 5 mM völlig verloren. 0,4 mg/ml Citrat inaktivierten LF vollkommen, allerdings konnten die Autoren keinen Einfluß von Bikarbonat auf die LF-Wirkung feststellen.

Gereinigtes LF hemmte in Untersuchungen von REITER und ORAM (1967) sowohl *B.stearothermophilus* als auch *B.subtilis*. Auch bei ASHTON und BUSTA (1968) wurde mit aus einer Caseinfraction extrahiertem LF das Wachstum von *B.stearothermophilus* gehemmt.

Lysozym

Lysozym, ein hitzelabiles (WEAVER und KROGER, 1978), antibakteriell wirkendes Enzym, kommt in Körpersekreten wie Speichel, Tränen und Milch, sowie in intestinalen und alveolären Geweben, sowie in Makrophagen und Monozyten vor (REITER, 1978b). In Kuhmilch (13 µg/100 ml) ist seine Konzentration verglichen mit Frauenmilch (39 mg/100 ml) bedeutend geringer; am reichhaltigsten ist es im Eiklar zu finden (CHANDAN et al., 1964; REITER, 1978a). Das in der Kuhmilch befindliche Lysozym läßt sich elektrophoretisch jedoch vom Lysozym des Eiklars unterscheiden (KIELWEIN, 1985). Ersteres ist in seinem Aufbau dem α -Laktalbumin sehr ähnlich, wobei 51 Aminosäuren identisch sind. Lysozym spaltet die β -1,4-glykosidische Bindung zwischen N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglukosamin im Peptidoglycan der Zellwand von grampositiven Keimen und die äußere Wand der gramnegativen Mikroorganismen (REITER, 1978b).

Nach GOUDSWAARD et al. (1978) kommt Lysozym vermehrt in Mastitismilch und im Kolostrum vor. In ihren Untersuchungen fanden die Autoren bei 19 gesunden Vierteln nur dreimal Lysozym, während in Mastitismilch 25 von 33 Proben bis zu 3,6 µg/ml und vier sogar 10 µg/ml aufwiesen. Im Kolostrum wiesen sie das Enzym in vier von fünf Proben nach.

Lysozym ist in der Lage, bei einem *B.subtilis*-Agar-Diffusionstest Hemmhöfe zu bilden (HEINERT et al., 1976). GOUDSWAARD et al. (1978) fanden *B.stearo-*

thermophilus als empfindlich gegenüber Lysozym. Von anderen Hemmstoffen wie Antibiotika kann es nach TERPLAN et al. (1973) mittels einer Dialysemembran abgegrenzt werden. Wegen seiner größeren Molekularstruktur diffundiert Lysozym nicht und bleibt somit auf der Probenseite zurück.

Laktoperoxidase-Thiozyanat-Wasserstoffperoxid-System

Laktoperoxidase (LP) kommt nicht nur in Milch, sondern u.a. auch in Speichel und Tränenflüssigkeit vor (REITER, 1983). Die Konzentration der säurebeständigen LP beträgt nach KIELWEIN (1985) in der Milch ca. 100 mg/l Milch.

Das Thiozyanat-Anion (SCN^-) ist ubiquitär in tierischem Gewebe, verschiedenen Sekreten, Synovia, Zerebralflüssigkeit und auch in Lymphozyten zu finden. Es entsteht zum Teil endogen in Leber und Niere aus Thiosulfat und Zyanid, hauptsächlich wird es jedoch oral als Anion, Ester oder anderen Vorstufen aufgenommen. Die Ausscheidung über den Harn erfolgt rasch. Der Gehalt der Milch an SCN^- kann durch Fütterung, z.B. von Kohlgewächsen, erhöht werden (REITER, 1983).

Allgemein wird angenommen, daß Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in der Milch nicht oder nur in geringer Konzentration vorliegt. Zu meßbaren Werten an H_2O_2 kommt es nach KORHONEN (1981) durch Stoffwechselvorgänge nach Phagozytose von Kaseinmizellen und Fettkügelchen in den Leukozyten der Milch. Als H_2O_2 -Quelle im Intestinum von Jungtieren und Milchkälbern dienen die Milchsäurebakterien, die bei Kälbern normalerweise in großer Zahl im Labmagen vorkommen (REITER et al., 1980).

Die Funktion des hitzelabilen LP- SCN^- - H_2O_2 -Systems beruht auf einer Komplexbildung von LP mit H_2O_2 und der Oxidation von SCN^- zu einem bakteriziden Zwischenprodukt, dem Hypothiozyanat (REITER, 1978a; 1983). Die Endstufen (Sulfate oder Ammoniak etc.) sind alle inert und antibakteriell unwirksam. Durch die Zellwandschädigung der Keime wird sowohl die Aufnahme von Nährstoffen in die Bakterienzelle, als auch die Synthese von Proteinen, DNA und RNA verhindert. Gramnegative Keime werden abgetötet, während grampositive nur eine zeitlich begrenzte Hemmung erfahren (REITER, 1983). Durch Cystinzugabe ist die Hemmung aufhebbar (REITER, 1978a; 1983; MICKELSON und BROWN, 1985).

2.2.4 Postsekretorisch in die Milch gelangte Hemmstoffe

Mikrobiell entstandene Hemmstoffe

Als thermostabil bei 80 °C (5 Minuten) haben sich nach KRAACK und REICHMUTH (1971) auch die von KOSIKOWSKI (1963), TERPLAN (1969) sowie TERPLAN et al. (1973) erwähnten Hemmstoffe gezeigt, die in keimreichen Proben zu finden waren. KOSIKOWSKI (1963) sieht die hitzeresistenten Hemmstoffe als Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen an. FORSCHNER (1973) fand heraus, daß es sich bei diesen um Keimgemische von insbesondere Streptokokken, coliformen Keimen und Fluoreszenten handelt. Bakteriologische Prozesse in der Milch können zur Entstehung von wärmestabilen Stoffwechselprodukten führen, die hemmend auf Testkeime wirken. KOSIKOWSKI und O'LEARY (1963) fanden bei niedrigerem pH-Wert der Milch und hoher Bakterienzahl im allgemeinen größere Hemmhöfe als bei Milch mit normalem pH-Wert und geringer Keimzahl. Deshalb reagiert wohl, wie auch schon WOLIN und KOSIKOWSKI (1955) herausfanden, Mastitismilch im Hemmstofftest anders, als Milch eines gesunden Tieres. TERPLAN (1969) weist jedoch darauf hin, daß der Keimgehalt der rohen Milch nur zum kleinen Teil mammären Ursprungs ist, meistens von den Gerätschaftsoberflächen stammt und somit postsekretorisch bedingte Faktoren sind.

Aus der Umwelt stammende Hemmstoffe

Postsekretorisch können Hemmstoffe vor allem durch Rückstände von Reinigungs- und Desinfektionsmitteln aus der Melkanlage oder absichtlich zugesetzt in die Milch gelangen.

LAUERMANN et al. (1981) untersuchten verschiedene Desinfektionsmittel in unterschiedlichen Konzentrationen in der Milch im Hinblick auf die Beeinflussung von Hemmstoffnachweisen. Sie fanden, daß 20–50 g der Mittel pro Liter Milch (je nach Wirkstoffgehalt des Mittels) nötig wären, um meßbare Hemmhöfe zu erzielen. Sie rechneten diese Werte in eine 0,5%ige Reinigungslösung um: es wären 120–300 Liter Reinigungslösung erforderlich, um 20 Liter Milch hemmstoffpositive Eigenschaften zu verleihen. OBIGER (1970) konnte in einem Versuch mit 13 untersuchten Reinigungs- und Desinfektionsmitteln in verschiedenen Konzentrationen in Milch bei vier Präparaten in 1%iger Lösung keine Wirkung im BRT feststellen. Bei acht Präparaten traten positive Ergebnisse ab 0,5%igen Lösungen auf.

Im allgemeinen kommt es also, beim Vorliegen von Desinfektionsmittelrückstän-

den, nach BRANDL (1973) selbst bei fehlender oder ungenügender Nachspülung der Melkgeräte und Melkanlagen, noch nicht zu positiven Ergebnissen im BRT. OBIGER (1970) ebenso wie KRAACK und REICHMUTH (1971) sagen, daß bei sachgemäßer Anwendung nicht mit Reinigungsmittel- oder Desinfektionsmittelrückständen zu rechnen ist.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material

3.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere standen 154 Höhenfleckviehkühe im Alter von vier bis zehn Jahren aus 49 Milchviehbeständen, die von einer Großtierpraxis in Oberbayern betreut wurden, zur Verfügung. In allen Betrieben wurde mit Melkmaschinen gemolken. Bei Verabreichung des Trockenstellers (s. Methodik) zeigten die Tiere, bis auf drei an klinischer Mastitis erkrankten, ungestörtes Allgemeinbefinden. Sie standen während der gesamten Trockenperiode unter tierärztlicher Kontrolle. Die tägliche Milchmenge der Kühe vor dem Trockenstellen betrug zwischen 3 bis 12 Liter, bei über 90 % unter 10 Liter. Der Versuch erstreckte sich über die Zeit vom 30. September 1984 bis 22. April 1985, von der ersten Kuh an, die trockengestellt wurde, bis zur letzten Kalbung.

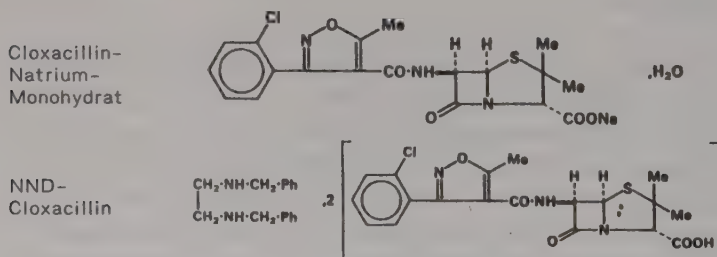
3.1.2 Trockensteller

Als Trockensteller wurde das Präparat "Cloxacillin-ts-1000^R" der Firma Virbac verwendet. Ein Euterinjektor mit 9,3 g Salbe enthält als Wirkstoffe 800 mg Cloxacillin, N,N'-Dibenzylethylendiaminsalz (NND-Cloxacillin), eine langsam wirkende Komponente und 200 mg Cloxacillin-Natrium-Monohydrat, einen gut wasserlöslichen und deshalb schnell wirksamen Bestandteil sowie 250 mg Glyceroltris (hydroxy-stearat), 94,2 mg Benzylalkohol, 1,8 mg Butylhydroxyanisol und 7,954 g Oleum Arachidis als Salbengrundlage. Chemische Zusammensetzung, Molekulargewicht und Wasserlöslichkeit der wirksamen Bestandteile des Trockenstellers geben die Übersichten 1 und 2 wieder.

Übersicht 1: Summenformel, Molekulargewicht und Wasserlöslichkeit von Cloxacillin-Natrium-Monohydrat und von NND-Cloxacillin

Substanz	Summenformel	Molekulargewicht	Wasserlöslichkeit
Cloxacillin Natrium- Monohydrat	$C_{19}H_{17}ClN_3NaO_5S \cdot H_2O$	475,9	gut
NND- Cloxacillin	$C_{16}H_{20}N_2(C_{19}H_{18}ClN_3O_5S)_2$	112,1	schlecht

Übersicht 2: Strukturformeln von Cloxacillin-Natrium-Monohydrat und NND-Cloxacillin



Das Cloxacillin, welches erstmals von NAYLER et al. (1962) als 3-o-chlorphenyl-5-methyl-4-isoxazolyl-penicillin erwähnt wird, gehört zu den halbsynthetischen Penicillinen. Es zeichnet sich durch eine weitgehende Stabilität gegenüber Staphylokokken-Penicillinase aus, weshalb es gegen Penicillinase-positive Staphylokokken eine bedeutend höhere Wirkung besitzt als Penicillin G. Das Wirkungsspektrum betrifft grampositive Keime. Aufgrund der Zusammensetzung wird ein rasches Anfluten des Wirkstoffes durch Cloxacillin-Natrium-Monohydrat und die Aufrechterhaltung des Wirkstoffspiegels während der Trockenperiode durch NND-Cloxacillin gewährleistet.

Die Wartezeiten für "Cloxacillin-ts-1000^R" werden vom Arzneimittelhersteller für eßbares Gewebe und Milch bei trockenstehenden Tieren, die innerhalb von 35 Tagen vor dem Geburtstermin behandelt werden, mit 40 Tagen angegeben. Bei einer davor liegenden Anwendung gilt eine Wartezeit bis einschließlich fünf Tage nach Beginn der Laktation.

3.2 Methodik

3.2.1 Versuchsablauf

Der Versuch gliederte sich in zwei zeitlich voneinander getrennte Abschnitte.

Abschnitt 1:

Vor dem Trockenstellen wurden Viertelgemelksproben entnommen und zyto-bakteriologischen (siehe Abschnitt 3.2.5 und 3.2.6) sowie Untersuchungen auf Hemmstoffe (siehe Abschnitt 3.2.4) unterzogen. Danach wurde der Trockensteller verabreicht (siehe Abschnitt 3.2.3).

Abschnitt 2:

Nach der Kalbung wurden am 6. Tag post partum (p.p.) erneut Viertelgemelksproben entnommen und bakteriologisch untersucht. Die Untersuchung auf Hemmstoffe erfolgte sowohl in den Viertel- als auch in den Gesamtgemelken. Am 7. Tag p.p. wurden die Milchproben nur auf Hemmstoffe untersucht. Dies geschah auch an den darauffolgenden Tagen, bei den Tieren, deren Gemelke bisher hemmstoffpositiv gewesen waren sowie bei zufällig gewählten Stichproben.

Neben diesem Hauptversuch wurde in der Zeit vom 25. November bis 13. Dezember 1984, um offensichtlich unspezifische Hemmstoffgehalte abzuklären, zusätzlich von sechs Kühen Milch auf Hemmstoffe untersucht. Diese Tiere waren nicht oder höchstens vier Monate trächtig (also nicht zum Trockenstellen vorgesehen). Sie stammten aus vier Betrieben des Hauptversuches.

3.2.2 Probenentnahme

Die Viertelgemelksproben wurden entsprechend dem von der DVG (1980) beschriebenen Referenzverfahren entnommen. Nach der Desinfektion der Zitzenkuppen mit 70%igem Alkohol – bei starker Verschmutzung wurde das Euter zu-

vor naß gereinigt - wurde die Milch in sterile, 10 ml fassende Plastikröhrchen gemolken. Dabei wurde darauf geachtet, die Keimkontamination auszuschließen. Deshalb wurde das Gefäß unter der Kuh geöffnet und auch verschlossen und beim Füllen schräg oder waagrecht gehalten.

Für die Untersuchung auf Cloxacillin-Rückstände wurden ausschließlich Endviertelgemelke entnommen. Die Gesamtgemelksproben (ca. 10 ml) wurden aus der Kanne mit einem sterilen Schöpflöffel genommen, nachdem die Milch durch Umrühren gut durchmischt worden war. Nach spätestens 12 Stunden gelangten die bei 4 °C gekühlten, nicht konservierten Proben zur Untersuchung ins Laboratorium.

3.2.3 Trockenstellen

Nach klinischer Untersuchung des Euters, Durchführung des Schalmtests (siehe Abschnitt 3.2.5.1) und erfolgter Probenentnahme (siehe Abschnitt 3.2.2) wurde das Euter letztmalig in der Laktation ausgemolken. Anschließend wurden die Zitzenkuppen gereinigt und desinfiziert. In jedes Euterviertel wurde der Inhalt je eines Injektors verabreicht, ohne das Mittel hochzumassieren, um Pfropfbildungen zu vermeiden. Das Trockenstellen erfolgte mindestens 6 Wochen vor dem voraussichtlichen Abkalbetermin, da die vom Hersteller des Präparates vorgeschriebene Wartezeit eingehalten werden sollte. Von diesem Zeitpunkt an wurde das Euter keiner weiteren Behandlung mehr unterzogen, jedoch gelegentlich adspektisch kontrolliert.

3.2.4 Untersuchung auf Hemmstoffe

Die Untersuchung auf Hemmstoffe wurde mit zwei verschiedenen Nachweisverfahren durchgeführt.

3.2.4.1 Agar-Diffusionstest

Dieser Test wurde sowohl vor dem Trockenstellen als auch in der neuen Laktationsperiode angewendet. Die Durchführung geschah in Anlehnung an das Routineverfahren nach der Deutschen Norm DIN 10 182 Teil 3 (1983) bzw. nach der in die amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren aufgenommenen Methode L 01.00-18 (BGA, 1984). Als Testnährboden diente Plate Count Agar (Fa. Oxoid, CM 325), als Testkultur wurde *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953

verwendet. Das Nachweismedium wurde, wie in der Norm beschrieben, hergestellt, wobei anstatt ein, zwei Teile der abgeschwemmten Kultur zu 40 Teilen Agar zugefügt wurden. Dieser Testnährboden wurde in Petrischalen 3,5 mm dick ausgegossen, und gemäß dem Referenzverfahren nach DIN 10 182 Teil 1 (1981) bzw. der amtlichen Sammlung für Untersuchungsverfahren L 01.00-6 (BGA, 1980) wurden mit der zu untersuchenden Milch getränkte Filterpapierblättchen aufgelegt. Die Blättchen (Schleicher und Schüll Nr. 2668/2) hatten einen Durchmesser von 12,7 mm. Die Platten wurden bei 55 °C für 5 Stunden bebrütet und verblieben über Nacht während des Abkühlens im Brutschrank. Am nächsten Morgen wurde abgelesen. Wurde der Testkeim durch Hemmstoffe im Wachstum gehindert, entstanden klare Hemmzonen um das Blättchen, während der übrige Agar trüb blieb. Als hemmstoffpositiv galten Hemmzonen von mehr als 1 mm, die mittels Schublehre gemessen wurden. Bei positivem Ausfall dieses Tests am 6. und/oder 7. Tag p.p. wurden weiterhin täglich Milchproben entnommen bis alle Gemelke hemmstofffrei waren. Zur Absicherung der Spezifität der Hemmstoffuntersuchung wurden alle positiven Proben, auch die vor der Trockenstellung, bei 80 °C 10 Minuten lang erhitzt und nochmals im Agar-Diffusionstest untersucht. Außerdem wurden sie nach Zugabe von Penicillinase geprüft, wobei abweichend von der amtlichen Methode L 01.00-6, 40.000 E Penicillinase/ml Milch zugesetzt wurden. Nach GEDEK und BAATH (1976) muß mindestens die 30fache Konzentration der vom IMV für Penicillin empfohlenen (40 E/ml) genommen werden, da Cloxacillin relativ penicillinasefest ist. Das Vorkommen von Cloxacillin galt bei der von uns verwendeten Penicillinasekonzentration als gesichert, wenn durch Penicillinasezugabe die Hemmzonen verschwanden.

Um die Nachweisgrenze des Agar-Diffusionstests für Cloxacillin festzustellen und um Konzentrationen in Cloxacillin-positiven Proben zu ermitteln, wurde eine Eichkurve aufgestellt (Abb. 1). Hierzu wurden Verdünnungsreihen an drei aufeinanderfolgenden Tagen von in 1%igem Phosphatpuffer (pH 6,0) gelösten Cloxacillin in Konzentrationen von 1,0 bis 0,01 µg/ml durch Zugabe von hemmstofffreier Milch vorgenommen und in dreifachem Ansatz im Agar-Diffusionstest geprüft (ARRET et al., 1971). Zur Erstellung einer Eichkurve wurde aus neun Meßwerten für jede Konzentration der Mittelwert der Hemmzonen bestimmt und die Regressionsgerade anhand der Logarithmen der Konzentrationen berechnet.

3.2.4.2 Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT)

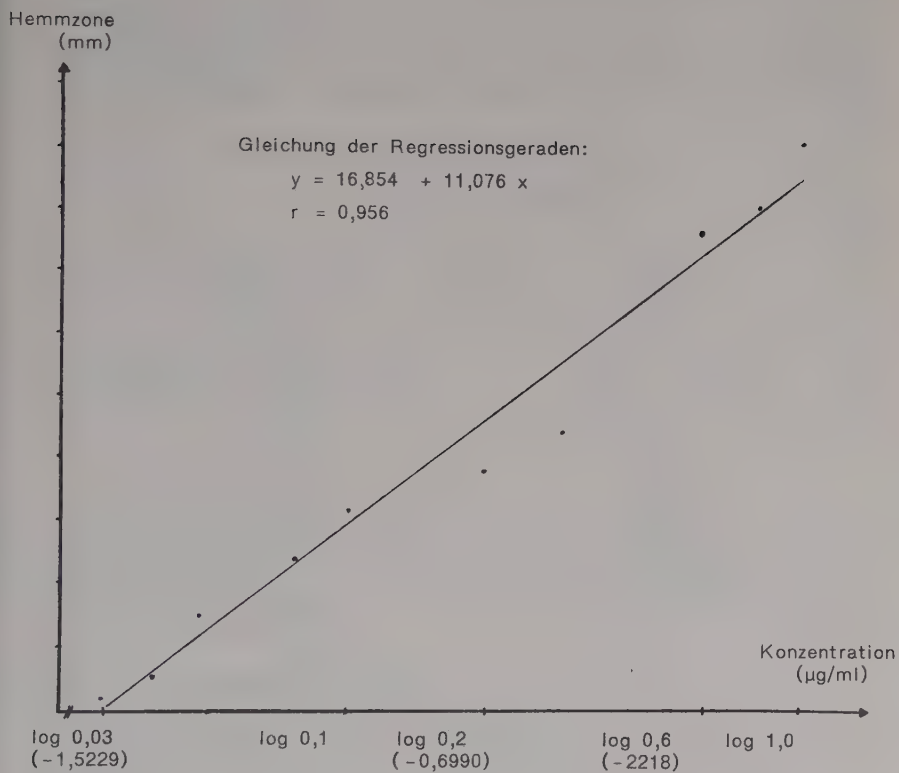
Dieses Routineverfahren mit *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953 wurde nach der Deutschen Norm DIN 10 182 Teil 2 (1982) bzw. der amtlichen Methode L 01.00-11 (BGA, 1982) an den Milchproben vom 6. und 7. Tag p.p. durchgeführt. Dazu wurden die Proben gesammelt, bei -20 °C eingefroren und nach Auftauen bei 45 °C im Wasserbad angesetzt.

Wie in der DIN-Norm wurden die Platten, die freundlicherweise von der Landesvereinigung der Bayerischen Milchwirtschaft zur Verfügung gestellt wurden, mit Penicillin-Standard, hemmstofffreiem Standard und den zu untersuchenden Milchproben beschickt. Nach Diffusionszeit im Kühlschrank, Abspülen der Milch und anschließender Bebrütung bei 65 °C im Klimaschrank wurde der Test abgelesen. Bei Nichtübereinstimmen der Ergebnisse von BRT und Agar-Diffusionstest wurde der Agar-Diffusionstest wiederholt.

Zur Feststellung der Nachweisgrenze des BRT für Cloxacillin wurden, wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, Verdünnungsreihen angesetzt und im BRT geprüft.

Die im Agar-Diffusionstest auch im BRT angesetzten Konzentrationen der Standardverdünnungsreihe ergaben für beide Verfahren eine Nachweisgrenze von jeweils 0,03 µg Cloxacillin/ml Milch.

Abb. 1: Cloxacillin-Eichkurve im Agar-Diffusionstest



3.2.5 Zytologische Untersuchungen

Mit Hilfe des California-Mastitis-Tests (CMT) (SCHALM, 1960) (siehe Abschnitt 3.2.5.1) wurde die Milch jedes Tieres vor dem Trockenstellen auf Zellgehalt untersucht. Von allen Viertelgemelksproben, die im CMT positiv oder zweifelhaft waren, wurden Kieler Ausstriche angefertigt (siehe Abschnitt 3.2.5.2).

3.2.5.1 California-Mastitis-Test (CMT)

Die ersten Milchstrahlen eines Viertels wurden nach Reinigung des Euters in eine CMT-Schale gemolken und mit dem Schalmtest^R (IFFA Merieux) versetzt. Die Auswertung erfolgt entsprechend dem Schlüssel von SCHALM (1960) (siehe Übersicht 3).

Übersicht 3: Beurteilungsschlüssel für den CMT

Reaktion	Konsistenz	vermutlicher Zellgehalt pro ml
-	unverändert	0-200 000
+/-	leichte Schlieren- bildung	150 000 - 550 000
+	deutliche Schlieren- bildung	400 000 - 1.500 000
++	leichte Gelbildung	800 000 - 5.000 000
+++	starke Gelbildung	über 5.000 000

3.2.5.2 Mikroskopische Untersuchung ("Kieler Sedimentausstrichverfahren")

Dieser Sedimentausstrich wurde, in Anlehnung an das schon 1928 von SEELMANN beschriebene Verfahren, nach Angaben der METHODENKOMMISSION (1960) angefertigt. Dazu wurden die Milchproben bei 3000 U/min zentrifugiert, und der Bodensatz in ein bis zwei Tropfen Wasser auf einem Objektträger mittels einer Öse ($\varnothing$ 2 mm) auf einer ovalen Fläche von ca. 3 cm² ausgestrichen. Nach Lufttrocknung und Hitzefixation wurde das Präparat mit 0,5%iger wäßriger Methylblaulösung 5 Minuten lang gefärbt. Unter dem Mikroskop wurden bei Öl-immersion 10 Gesichtsfelder semiquantitativ und qualitativ beurteilt. Bei der Bewertung wurde das von OBIGER (1962) angegebene Schema zu Hilfe genommen (siehe Übersicht 4).

Übersicht 4: Beurteilungsschlüssel des Sedimentausstrichs

1 - 5	Zellen/Gesichtsfeld	=	normaler Zellgehalt
> 5	Zellen/Gesichtsfeld	=	erhöhter Zellgehalt
	Zellen unzählbar, größere Zellanhäufungen, Zellkonglomerate	=	Sekretionsstörung, mikroskopisch nachweisbarer Eiter

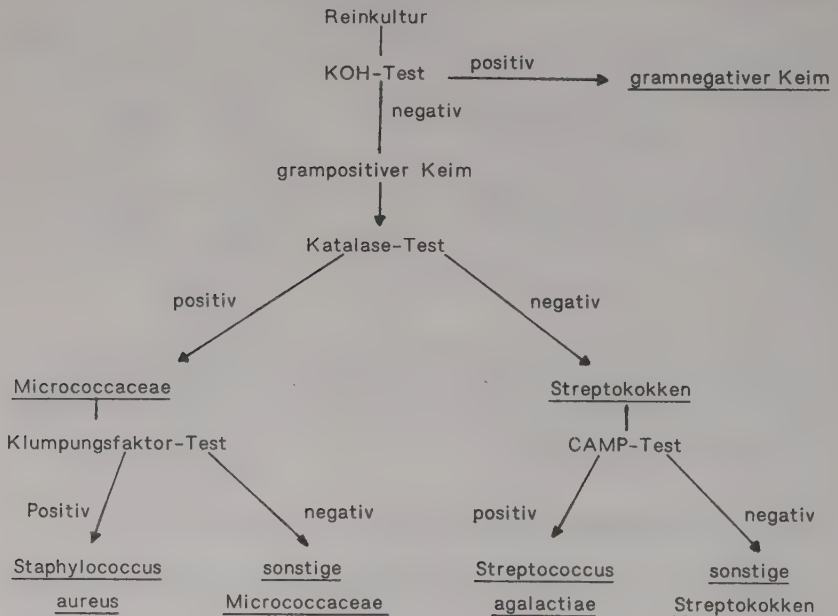
Die grobe Zelldifferenzierung erstreckte sich auf polymorphkernige Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten und Epithelzellen. Außerdem wurde auf Phagozytose geachtet. Das Vorkommen von Keimen wurde mit den bakteriologischen Untersuchungsergebnissen verglichen.

3.2.6 Bakteriologische Untersuchungen

Für den Nachweis von Mastitisserregern wurden die nicht zentrifugierten Viertel-gemelksproben mit einer genormten Platinöse (0,02 ml) auf Blutagarplatten ausgestrichen. Um eine möglichst konstante Ausführung zu gewährleisten, wurde bei jeder Probe auf gleichmäßige Eintauchgeschwindigkeit, -tiefe und -winkelung der Öse geachtet (SCHÄFER, 1966). Die verwendeten Blutagarplatten (Columbia

Agar Base, Fa. Oxoid, CM 331 mit 6 % gewaschen Rindererythrozyten (DVG, 1980) und 0,1 % Äskulinzusatz, Fa. Merck 848) wurden 48 Stunden bei 37 °C bebrütet und die gewachsenen Kolonien anschließend quantitativ und qualitativ ausgewertet. Vereinzelttes Wachstum von weniger als 5 Kolonien pro Ausstrich wurde als geringer, mehr als 5 Kolonien pro Ausstrich als starker Keimgehalt gewertet. Zur groben Differenzierung von Kolonien möglicher Mastitiserreger wurden außer der Beurteilung von Morphologie, Pigmentbildung, Hämolysevermögen und Äskulinspaltung verschiedene Testverfahren durchgeführt. Übersicht 5 zeigt, nach welchem Schema hierbei vorgegangen wurde.

Übersicht 5: Schema des Untersuchungsganges der aus den Viertelsekretproben isolierten Keime



Der KOH-Test (GREGERSEN, 1978) diente zur Differenzierung zwischen grampositiven und gramnegativen Keimen. Ein Teil der zu untersuchenden Kolonie wird dabei mit einem Tropfen 3%iger KOH-Lösung gut vermischt. Wenn das Material bei Abheben der Öse vom Objektträger Fäden zog, galt dieser Keim als gramnegativ.

Bei grampositiven Keimen wurde nicht weiter zwischen Stäbchen und Kokken unterschieden, da grampositive Stäbchen nur sehr selten Ursache für subklinische Mastitiden sind und außerdem die Kolonieform gewisse Hinweise gibt. Bei Verdacht auf *Corynebacterium* (C.) *pyogenes* jedoch wurde stets eine GRAM-Färbung angefertigt.

Die Differenzierung zwischen Micrococcaceae und Streptokokken erfolgte durch die Katalase-Reaktion. Wenn es sich um Micrococcaceae handelte, wurde bei Verreiben der zu untersuchenden Kolonie in 3%iger H_2O_2 -Lösung durch O_2 -Freisetzung Gasbildung hervorgerufen. Zur weiteren Abklärung von Micrococcaceae-Kolonien, deren Form, Farbe und eventuell Hämolyse auf Staphylokokken (S.) *aureus* hinwiesen, wurde der Klumpungsfaktor-Test angewandt (DVG, 1980). Dazu wurde die zu testende Kolonie mit Zitratplasma von Kaninchen oder Schwein verrieben. Außerdem wurde eine entsprechende Kontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt, um Spontanagglutinationen auszuschließen. Bei Verklumpungen der Bakterienmasse wurden die Kolonien zu der Spezies *S.aureus* zugeordnet. Bei negativem Ausfall des Tests wurden die Keime als sonstige Micrococcaceae bezeichnet.

Der Verdacht, daß es sich bei grampositiven, äskulinnegativen und katalasennegativen Kolonien unter Berücksichtigung von Kolonieform und Hämolyse um *Streptococcus* (Sc.) *agalactiae* handeln könne, wurde durch den positiven Ausfall des sogenannten CAMP-Tests (CHRISTIE, ATKINS und MUNCH-PETERSEN, 1944) abgesichert. Dieser wurde in Anlehnung an die von der DVG (1980) empfohlenen bzw. in der nächsten Zeit im Rahmen der amtlichen Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG zu erwartenden Methodik durchgeführt. Zur Herstellung der verwendeten Blutagarplatten diente DST-Agar-Basis (Fa. Oxoid, CM 261) mit 6 % gewaschenen Rindererythrozyten und 0,1 % Äskulinzusatz. Der Test, der erstmals 1956 in Deutschland von SEELEMANN und OBIGER beschrieben wurde, zeigt bei *Sc.agalactiae* das CAMP-Phänomen mit der typischen keil- bzw. schalenförmigen Hämolyse in der β -Toxinzone des *S.aureus*-Stammes. In diesem Test negativ

reagierende Streptokokken und auch nicht im CAMP-Test untersuchte, grampositive, katalasenegative Keime wurden als sonstige Streptokokken zusammengefaßt.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Übersicht über den Ablauf des Versuchs

Von den 154 Kühen, die trockengestellt wurden, schieden 23 Tiere aus dem Versuch aus. Hierbei handelte es sich um elf Tiere, die während des Versuchs verkauft worden waren oder deren Kalbung vom Tierhalten nicht gemeldet worden war. Zwölf Kühe wurden wegen antibiotischer Behandlung von Mastitiden, Euterverletzungen oder behandelten Uteruserkrankungen nicht in die Ergebnisse eingeschlossen. Es konnten also nur 131 Tiere ausgewertet werden. Die Anzahl der Milchproben dieser Kühe betrug vor dem Trockenstellen 520 (vier Kühe waren dreistrichig) und post partum 1412 (es wurden bei den einzelnen Tieren unterschiedlich häufig Proben entnommen).

Über die Hälfte der Tiere war länger als 8 Wochen mit Antibiotikaschutz trockengestellt, 9,2 % sogar länger als 11 Wochen. Nur bei drei Kühen lag diese Zeit unter 6 Wochen, hiervon bei einem Tier unter 5 Wochen. Bei allen übrigen Kühen dauerte die Trockenstellzeit unter Cloxacillinschutz 6 bis 8 Wochen (Tab. 1).

Tab. 1: Länge der Trockenperiode, vom Tage der Trockenstellung bis zur Kalbung

Länge der Trockenperiode unter Antibiotikaschutz in Wochen	Anzahl der Tiere (%)
< 6	3 (2,3)
6 - 8	51 (38,9)
8 - 11	65 (49,6)
> 11	12 (9,2)

3.3.2 Untersuchung auf Hemmstoffe

3.3.2.1 Vor dem Trockenstellen

Schon vor dem Verabreichen des Trockenstellers wurden bei etwa der Hälfte der 131 Tiere, entsprechend in 199 Viertelgemelksproben, jeweils in der Milch eines oder mehrerer Euterviertel einer Kuh Hemmstoffe gefunden. Bei zwei Drittel dieser Tiere bzw. 159 Proben verschwanden die Hemmzonen, nachdem die Milch erhitzt worden war. 321 untersuchte Milchproben waren, auch ohne Erhitzen, frei von Hemmstoffen (Tab. 2)

Tab. 2: Ergebnisse der Hemmstoffuntersuchungen vor dem Trockenstellen mit Cloxacillin

Proben	Anzahl der Tiere (%)	Anzahl der Viertelgemelke (%)
insgesamt entnommen	131 (100)	520 (100)
positiv	67* (51,1)	199 (38,2)
davon nach Erhitzen negativ	44 (65,7)	159 (79,9)
negativ (alle Viertel)	64** (48,9)	252 (48,5)
negative Proben von Kühen mit positiven Viertelgemelken		69 (13,3)
insgesamt negative Proben		321 (61,7)

*) Kühe, bei denen mindestens eine Viertelgemelksprobe hemmstoffpositiv ausfiel.

**) Kühe, bei denen alle vier Viertelgemelksproben hemmstoffnegativ ausfielen.

Nach Versetzen der Sekretproben, die hitzelabile Hemmstoffe enthielten, mit Penicillinase blieben die Hemmzonen bestehen. Auch bei den 40 Viertelgemelken, die durch Erhitzen ihre antibakterielle Wirkung nicht verloren, konnten die

Hemmstoffe durch Penicillinasezugabe nicht inaktiviert werden. Die auch nach Erhitzen positive Milch war, bis auf zwei Ausnahmen (im Januar 1985), nur in dem Zeitraum vom 18. November bis zum 2. Dezember 1984 aufgetreten. Die thermolabilen Hemmstoffe kamen hingegen über den gesamten Versuchszeitraum vor.

Bei mehr als der Hälfte der Tiere, die mit der Milch Hemmstoffe ausschieden, war die Milch aller vier Euterviertel hemmstoffpositiv. Ein Viertel allein war bei 22,4 % der Kühe betroffen. Die Anzahl der Tiere, die auf zwei oder drei Eutervierteln hemmstoffhaltige Milch ausschieden, hielt sich mit 10,5 bzw. 14,9 % in etwa die Waage (Tab. 3).

Tab. 3: Anzahl hemmstoffpositiver Viertel bei den einzelnen Tieren

Anzahl hemmstoff- positiver Viertel	Anzahl der Tiere (%)
4	35 (52,2)
3	10 (14,9)
2	7 (10,5)
1	15 (22,4)

Die Größe der Hemmzonen betrug bei etwa 80 % der Viertelsekretproben 1-3 mm. Zwischen 3-5 mm lagen 16,6 % und nur sechs (3,0 %) Milchproben bewirkten Hemmzonen von mehr als 5 mm (Tab. 4).

Tab. 4: Größen der Hemmzonen der vor dem Trockenstellen positiven Viertelgemelksproben

Hemmzonen in mm	Anzahl der Viertel- gemelksproben (%)
1 - 2	97 (48,7)
2 - 3	63 (31,7)
3 - 5	33 (16,6)
> 5	6 (3,0)

Bei den sechs nicht trockengestellten Kühen, die im Nebenversuch auf Hemmstoffe untersucht wurden, waren von den 24 entnommenen Viertelgemelksproben 22 Proben hemmstoffpositiv ausgefallen und blieben es auch nach Erhitzen. Versetzen der Milch mit Penicillinase konnte die Hemmwirkung nicht aufheben. Die Größe der Hemmzonen betrug bei allen Milchproben weniger als 3 mm.

3.3.2.2 Nach dem Kalben

Nach dem Kalben ließen sich nur bei einer der 131 trockengestellten Kühe im Agar-Diffusionstest Hemmstoffe in der Milch nachweisen (Tab. 5), und zwar am 6. Tag p.p. in zwei Viertelgemelken und im Gesamtgemelk, am 7. Tag in einem Viertelgemelk und ebenfalls im Gesamtgemelk (Tab. 6). An den darauffolgenden Tagen (8., 9., 10. Tag p.p.) fiel der Hemmstofftest negativ aus. Bei allen anderen Tieren wurden im Agar-Diffusionstest keine Hemmstoffe in der Milch gefunden. Dementsprechend waren von 1412 p.p. untersuchten Proben 1407 hemmstoffnegativ (Tab. 5).

Tab. 5: Ergebnisse der Hemmstoffuntersuchungen von Viertel- und Gesamtgemelken nach dem Kalben im Agar-Diffusionstest

	Anzahl der Tiere	Anzahl der Proben
negativ	130	1407
positiv	1	5

Im BRT, der später an den eingefrorenen und wieder aufgetauten Milchproben vorgenommen wurde, zeigten 21 Proben von 17 Tieren am 6. und/oder 7. Tag p.p. positive Reaktionen (Tab. 7). Eine Wiederholung der Untersuchung im Agar-Diffusionstest bestätigte diese Ergebnisse bei sechs Proben von vier Tieren. Nach Zugabe von Penicillinase blieben die Milchproben hemmstoffpositiv. Die Milch der in Tab. 6 angeführten Kuh war im BRT negativ.

Tab. 6: Hemmzonengrößen (in mm) der Viertelgemelksproben und des Gesamtgemelks

	6. Tag p.p.	7. Tag p.p.
A	-	-
B	-	-
C	2,0	-
D	1,9	1,7
G	1,8	1,9

A: rechtes Vorderviertel

B: rechtes Hinterviertel

C: linkes Vorderviertel

D: linkes Hinterviertel

G: Gesamtgemelk

Tab. 7: Ergebnisse der Hemmstoffuntersuchungen p.p. im BRT (nach Einfrieren der Proben)

	Anzahl der Tiere (%)	Anzahl der Proben (%)
negativ	114 (87,0)	1391 (98,5)
positiv	17 (13,0)	21 (1,5)

Stichproben, die über den 7. Tag p.p. hinaus entnommen wurden, waren alle hemmstofffrei. Es wurden insgesamt 95 Milchproben vom 8. bis einschließlich zum 12. Tag p.p. untersucht.

3.3.3 Untersuchungen auf Eutergesundheit

3.3.3.1 Vor dem Trockenstellen

3.3.3.1.1 Zytologische Untersuchungen

Vor der Applikation des Trockenstellers wurde bei 520 Viertelgemelksproben der California-Mastitis-Test (CMT) durchgeführt und entsprechend dem Originalschlüssel von SCHALM (1960) bewertet. Bei 76,5 % der Proben fiel der Test negativ aus, eindeutig positiv waren 16,0 % und zweifelhaft 7,5 % (Tab. 8). Von den 131 Tieren zeigten 66 (50,4 %) auf mindestens einem Viertel CMT-positive bzw. zweifelhafte Ergebnisse (Tab. 9).

Tab. 8: Ergebnisse des CMT bei 520 Viertelgemelksproben vor dem Trockenstellen

Befunde im CMT	Anzahl der Proben (%)
-	398 (76,5)
+/-	39 (7,5)
+	56 (10,8)
++	21 (4,0)
+++	6 (1,2)
insgesamt	520 (100)

Von den 122 positiven bzw. zweifelhaften Proben, bei denen ein Kieler Ausstrich angefertigt wurde, zeigten bei der mikroskopischen Untersuchung 37,7 % normalen, 54,1 % erhöhten und 8,2 % stark erhöhten Zellgehalt (Tab. 10). Es wiesen also nur 76 (62,3 %) der 122 CMT-positiven Milchproben auch aufgrund des Kieler Ausstrichs einen erhöhten bzw. stark erhöhten Zellgehalt auf. Dadurch verringerte sich der Prozentsatz der Gemelke mit vermehrtem Zellgehalt von 23,5 auf 14,6 %. Der Anteil der Kühe mit erhöhtem und stark erhöhtem Zellgehalt auf mindestens einem Viertel belief sich hierbei auf 29,0 % (38 Tiere).

Tab. 9: Ergebnisse des CMT bei 131 Tieren vor dem Trockenstellen

Anzahl der CMT-positiven *) Viertel pro Kuh	Anzahl der Tiere(%)
0	65 (49,6)
1	34 (25,9)
2	14 (10,7)
3	12 (9,2)
4	6 (4,6)
insgesamt	131 (100)

*) +/- bis +++

Tab. 10: Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung bei 122 Viertel-
gemelksproben mit positivem oder zweifelhaftem CMT

Befund	Anzahl der Viertel (%)
normale Zellgehalt	46 (37,7)
erhöhter Zellgehalt	66 (54,1)
stark erhöhter Zellgehalt	10 (8,2)

Stark erhöhter Zellgehalt war stets mit einer Vermehrung der polymorphkernigen Granulozyten verbunden. In diesem Fall waren, ebenso wie bei erhöhtem Zellgehalt, auch vermehrt Lymphozyten und Monozyten zu finden. Epithelzellen traten vereinzelt auf und Phagozytose wurde bei stark erhöhtem Zellgehalt dreimal festgestellt.

3.3.3.1.2 Bakteriologische Untersuchungen

In 52 der 520 Viertelgemelksproben konnten vermehrt (> 5 Kolonien pro Ausstrich) euterpathogene oder potentiell pathogene Keime nachgewiesen werden. Davon zeigten 39 Proben mikroskopisch erhöhten oder stark erhöhten Zellgehalt. Dies entspricht 51,3 % der insgesamt 76 Proben, die im Kieler Ausstrich erhöhten oder stark erhöhten Zellgehalt aufwiesen. Bei normalem Zellgehalt wurden 13 bakteriologisch positive Befunde erhoben. Meist handelte es sich hierbei um sonstige Micrococcaceae und gramnegative Keime (Tab. 11).

Tab. 11: Anteil der bakteriologisch auffälligen Befunde in 520 untersuchten Viertelgemelksproben vor dem Trockenstellen unter Berücksichtigung der mikroskopischen Befunde

Bakteriologischer Befund	Anzahl der Proben (%)	
	bei erhöhtem/stark erhöhtem Zellgehalt	bei normalem Zellgehalt
<i>S. aureus</i>	6 (15,4)	3 (23,1)
sonstige Micrococcaceae	13 (33,3)	4 (30,8)
<i>Sc. agalactiae</i>	4 (10,3)	4 (30,8)
sonstige Streptokokken	5 (12,8)	0
gramnegative Keime	10 (25,6)	2 (15,3)
<i>C. pyogenes</i>	1 (2,6)	0
insgesamt	39 (100)	13 (100)

Die meisten der insgesamt 47 Tiere mit auffälligem bakteriologischen Befund in den Viertelgemelken wiesen positive Ergebnisse auf nur einem Viertel auf. Bei vier Kühen wurden jeweils dieselben Keime in zwei oder drei Viertelgemelksproben isoliert (Tab. 12).

Tab. 12: Häufigkeit kulturell positiver Viertel in Abhängigkeit vom Zellgehalt der Kühe

Anzahl der positiven Viertel pro Kuh	Anzahl der Kühe mit bakteriologisch positiven Vierteln	
	mit erhöhtem Zellgehalt	mit normalem Zellgehalt
1	32	11
2	2	1
3	1	0
4	0	0
insgesamt	35	12

3.3.3.2 Nach dem Kalben

Am 6. Tag p.p. wurden euterpathogene oder potentiell pathogene Keime aus insgesamt 37 Viertelgemelksproben von 33 Tieren isoliert (Tab. 13 und 14). Demnach hat sich die Anzahl der Kühe mit positiven Viertelgemelken gegenüber der Untersuchung vor dem Trockenstellen um 29,8 % verringert (bzw. 28,8 % der Viertelgemelke). Bei den 520 untersuchten Viertelgemelksproben haben sich die Befunde gramnegativer Keime fast verdoppelt (21), während sich die Häufigkeit von *S. aureus*-Nachweisen leicht verringert hat. Das Wachstum der "sonstigen Micrococcaceae" war auf etwa die Hälfte reduziert (9). *Sc. agalactiae* und "andere Streptokokken" wurden p.p. nicht mehr nachgewiesen. Tabelle 13 zeigt einen Vergleich der bakteriologischen Untersuchungsergebnisse vor dem Trockenstellen und nach der Kalbung. Unter Berücksichtigung des Zellgehaltes vor dem Trockenstellen wird dieser Vergleich in Tabelle 15 aufgezeigt.

Tab. 13: Anzahl der bakteriologisch auffälligen Befunde vor dem Trockenstellen und p.p.

Bakteriologischer Befund	Anzahl der positiven Viertelgemelke	
	vor dem Trockenstellen	nach der Kalbung
S. aureus	9	6
sonstige Micrococcaceae	17	9
Sc. agalactiae	8	0
sonstige Streptokokken	5	0
gramnegative Keime	12	21
C. pyogenes	1	1
insgesamt	52	37

Tab. 14: Häufigkeit der bakteriologisch auffälligen Viertel bei den einzelnen Tieren am 6. Tag p.p.

Anzahl der positiven Gemelke pro Kuh	Anzahl der Kühe mit positiven Gemelken
1	30
2	2
3	1
4	0

Tab. 15: Vergleich der bakteriologischen Befunde vor dem Trockenstellen und nach der Kalbung unter Berücksichtigung des Zellgehaltes vor dem Trockenstellen

Bakteriologi- scher Befund	Anzahl der positiven Viertelgemelke		
	vor dem Trockenstellen Zellgehalt		nach der Kalbung
	erhöht	normal	
S. aureus	6	3	6
sonstige Mi- crococccaceae	13	4	9
Sc. agalactiae	4	4	0
sonstige Streptokokken	5	0	0
gramnegative Keime	10	2	21
C. pyogenes	1	0	1
insgesamt	39	13	37

Bei 25 Vierteln konnten die nach der Kalbung festgestellten Mikroorganismen vor dem Trockenstellen nicht ermittelt werden (Nachweis von mehr als 5 Kolonien pro Ausstrich); die Besiedlungen der Euterviertel mit diesen Keimen waren also danach erfolgt. 40 bakteriologisch auffällige Befunde vor dem Trockenstellen waren p.p. nicht mehr nachzuweisen, und in den zwölf Vierteln waren dieselben Erreger vor dem Trockenstellen und am 6. Tag p.p. zu isolieren (Tab. 16). In drei Fällen heilte eine klinische Mastitis während der Trockenzeittherapie aus und eine entstand neu.

Tab. 16: Bakteriologische Befunde der Euterviertel am 6. Tag p.p. unter Berücksichtigung der bakteriologischen Befunde und des Zellgehaltes vor dem Trockenstellen

Bakteriologische Befund	Befunde vor dem Trockenstellen				
	nicht mehr nachweisbar		geblieben		neue auffällige Befunde
	Zellgehalt vor dem Trockenstellen				
	erh.	norm.	erh.	norm.	
S. aureus	6*)	1	-	2	4
sonstige Micrococcaceae	13*)	-	-	4	5
S. agalactiae	4	4	-	-	-
sonstige Streptokokken	5	-	-	-	-
gramnegative Keime	7*)	-	3	2	16
C. pyogenes	-	-	1	-	-

*) jeweils in einem Fall als klinisch manifeste Erkrankung.

4 BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ziel der medikamentellen Trockenstellung ist, gemeinsam mit anderen prophylaktischen Maßnahmen, Neuinfektionen des Euters in der Trockenzeit zu verhindern und bestehende subklinische Erkrankungen auszuheilen, um eine gute Milchqualität zu gewährleisten und die wirtschaftlichen Verluste durch Mastitiden zu verringern, die nach NEUMANN (193) rund 500 Mio. DM pro Jahr betragen. Da etwa 30 % der Neuinfektionen in der ersten Zeit der Laktationsperiode auftreten, ist die Prophylaxe in der Trockenperiode besonders effektiv (CHRISTIE et al., 1974; TOLLE; 1983).

Die Vorzüge der antibiotischen Versorgung während der Trockenperiode sind insbesondere eine nur einmalig nötige Behandlung mit hoher Anfangskonzentration, der wochenlange Wirkstoffspiegel, im allgemeinen kein Milchverlust durch Wartezeiten und kein Anfallen von antibiotikahaltiger Milch. Daher ist es in vielen Betrieben üblich, Trockensteller zu verabreichen. In dem dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuchsgebiet in Oberbayern wird hauptsächlich der eingesetzte Trockensteller ("Cloxacillin-ts-1000^R") verwendet.

Das Cloxacillin liegt sowohl in einer langsam als auch in einer schnell wirksamen Komponente vor, so daß der Wirkstoff zum einen schnell anflutet, wodurch eine Bekämpfung bereits vorhandener Keime erfolgt, zum anderen der lang anhaltende Spiegel Neuinfektionen verhindern soll. Allerdings darf dieser lang wirksame Bestandteil des Trockenstellers nach Ablauf der Wartezeit nicht mehr in der Milch vorhanden sein. Cloxacillin, als halbsynthetisches Penicillin, wirkt gegen grampositive Keime, die vor allem bei subklinischen Mastitiden eine vorrangige Rolle spielen. Nach DODD et al. (1977) machen 80 % aller euterpathogenen Keime *S. aureus* und *Streptokokken* aus.

Der Prozentsatz der hemmstoffhaltigen Milch, die an Molkereien geliefert wurde, lag früher mit 0,09 bis 3,4 % (OBIGER, 1963; TOLLE et al., 1968; KRAACK und TOLLE, 1969; LIMMER, 1969; BRUNN, 1971; KRAACK und REICHMUTH, 1971; NEUMANN et al., 1971; LUPKE, 1972; TERPLAN et al., 1972) im Durchschnitt höher als z.B. 1986 mit 0,15 % (MILCHPRÜFRING BAYERN, 1987). Da in der letzten Zeit jedoch vermehrt von Hemmstoffen in der Milch berichtet wurde, die von einem Oxacillin-Präparat stammten, das zur medikamentellen

Trockenstellung benutzt wurde, war es von Interesse, ob ähnliches auch bei Cloxacillin-Präparaten zu erwarten ist.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich das Medikament nach Ablauf der vom Hersteller angegebenen Wartezeit in der Milch noch nachweisen läßt. Gleichzeitig sollte geprüft werden, wie es sich auf die Eutergesundheit auswirkt.

Die Auswahl der Kühe, an denen der Versuch durchgeführt wurde, geschah rein zufällig. Es wurden weder Tiere eines bestimmten Alters, noch mit einer besonderen Milchleistung bevorzugt. Die Auswahl der Betriebe erfolgte unabhängig von deren hygienischen Zustand oder bisher durchgeführten mastitisprophylaktischen Maßnahmen. Die Melkanlage wurde nicht überprüft.

Der Applikation je eines Injektors des Trockenstellers in ein Viertel nach gründlichem Ausmelken und der Probenentnahme folgte keine weitere Behandlung.

Über die Hälfte der 131 Versuchstiere, entsprechend 38,2 % der Viertelgemelksproben, wiesen schon vor dem Verabreichen des Trockenstellers hemmstoffhaltige Milch auf. Die Hemmzonen waren zu etwa 80 % relativ klein (unter 3 mm). Nur sechs Proben zeigten Hemmzonen von mehr als 5 mm (s. Tab. 4). Die Hemmstoffe unterschieden sich in ihrer Hitzeempfindlichkeit. Fast 80 % waren thermolabil (s. Tab. 2). Zwischen der Größe der Zonen und der Hitzelabilität der Hemmstoffe ließ sich keine Beziehung herstellen. Auch bei den Viertelgemelken eines Tieres variierten die Hemmzonengrößen untereinander, ohne daß sich eine Gesetzmäßigkeit erkennen ließ. Auffallend war, daß nur 52,2 % der Kühe auf allen vier Vierteln Hemmstoffe ausschieden. Untersuchungen von FEUERSTEIN (1987) zeigten, daß die Ausscheidung von Antibiotikas nicht immer gleichzeitig über alle vier Viertel erfolgt, allerdings ist über die Ausscheidung anderer Hemmstoffe in dieser Hinsicht nichts bekannt.

Arzneimittelrückstände, insbesondere β -Laktamantibiotikarückstände, können als Ursache ausgeschlossen werden, da zum einen die Hemmhöfe nach Penicillinasezugabe bestehen blieben und zum anderen die Tierbesitzer angehalten waren, etwaige selbst durchgeführte Behandlungen sofort zu melden. Auch wenn man die von MOL (1968) genannten Prozentzahlen annehmen würde, nach denen bis

zu 16,8 % der Tierhalter keine Auskunft geben, wären Antibiotikabehandlungen in diesem Ausmaß nicht anzunehmen.

Schließt man also Arzneimittelrückstände als Ursache der nachgewiesenen Hemmstoffe aus, können sie entweder fütterungsbedingt oder endogenen Ursprungs sein.

Endogene Hemmstoffe sind vom Körper selbst gebildete Abwehrmechanismen. Wie schon SCHANBACHER und SMITH (1975) berichten, ist die Milchdrüse, einschließlich der von ihr gebildeten antibakteriellen Substanzen, zyklischen Veränderungen unterworfen. Nach NONNECKE und SMITH (1984a) steigt der Gehalt an Immunglobulinen, Serumalbuminen und Laktoferrin in der späten Laktation. Laktoferrin tritt in Zusammenhang mit polymorphkernigen Granulozyten auf (HARMON und NEWBOULD, 1980; SCHANBACHER und SMITH, 1975) und Immunglobuline lassen sich nicht nur im Kolostrum, sondern auch am Ende der Laktation vermehrt in der Milch finden (REITER und ORAM, 1967).

Ein Großteil der Kühe wurde mit Raps gefüttert, der als möglicher Hemmstoff bekannt ist (LIMMER, 1969; TERPLAN, 1969). Die von ZEITRÄG (1970) beobachtete Säuerungsträgheit bei Rapsfütterung verschwand nach Erhitzen der Milch. Vielleicht kann man auch damit die Herkunft der hitzelabilen Hemmstoffe begründen, allerdings nur zu einem Teil, da thermolabile Hemmstoffe auch bei Tieren auftraten, die nicht mit Raps gefüttert worden waren. Über andere Futterstoffe, wie Kresse, Rüben, Steckrüben u.a., die nach TERPLAN (1969) und ZEITRÄG (1970) ebenfalls antimikrobielle Wirkung besitzen, kann keine Aussage gemacht werden, da das Futter der Tiere auf diese Stoffe hin nicht analysiert wurde.

Hitzeresistente Hemmstoffe traten nur vom 18.11.1984 bis zum 13.12.1984 (mit zwei Ausnahmen im Januar 1985) auf, wodurch die Vermutung nahe liegt, daß es sich hierbei um Hemmstoffe gleichen Ursprungs handelt. Diese Hemmstoffe kamen unabhängig vom Laktationsstadium vor, da sowohl rund 20 % der Tiere in der Spätlaktation, als auch die Kühe des Nebenversuchs im frühen Laktationsstadium betroffen waren. Bei diesen Tieren lagen keine Eutererkrankungen vor, so daß eine mastitisbedingte Vermehrung endogener Hemmstoffe, wie des hitzestabilen Laktoferrins, nicht in Frage kommen. Es liegt also die Vermutung nahe, daß es sich um eine saisonbedingte Bakterizidie der Milch handelt. Als

Ursache solcher Hemmstoffe wurden schon von FRANK (1969) und TERPLAN (1969) Futterumstellung von Grün- auf Winterfutter genannt, was bei allen Versuchstieren im Dezember zutraf.

Bei den Untersuchungen nach dem Kalben konnten in der verkehrsfähigen Milch ab dem 6. Tag p.p. keine Cloxacillin-Rückstände nachgewiesen werden. Die Hemmstoffuntersuchungen an den 1412 Viertel- und Gesamtgemelksproben nach dem Abkalben ergaben, daß nur bei einem einzigen Tier am 6. und 7. Tag p.p. im Agar-Diffusionstest Hemmstoffe nachgewiesen werden konnten. Die Hemmzonen betrugen 1,7 bis 2,0 mm (s. Tab. 6). Die Hemmstofftests der Proben dieser Kuh an den darauffolgenden Tagen (8., 9. und 10. Tag p.p.) fielen negativ aus. Durch Erhitzen oder Penicillinasezusatz veränderten sich die Hemmzonen nicht. Deshalb ist auszuschließen, daß es sich hier um Cloxacillin-Rückstände gehandelt hat. Das Tier war schon vor dem Trockenstellen durch positive Hemmstoffbefunde aufgefallen, wobei thermolabile Hemmstoffe, die bedeutend größere Hemmzonen (2-4 mm) verursacht hatten, nachzuweisen waren. Wahrscheinlich handelt es sich sowohl vor dem Trockenstellen als auch p.p. um originäre oder um fütterungsbedingte Hemmstoffe, die aber angesichts ihrer unterschiedlichen Hitzeempfindlichkeit nicht identisch sein dürften. Beachtenswert sind in diesem Zusammenhang auch die von REITER (1978b) erwähnten unspezifischen Faktoren der Kolostralmilch. Auch nach WALLNER (1972) kann das Kolostrum *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* hemmen.

Im Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT) waren 21 Proben von 17 Tieren am 6. und/oder 7. Tag p.p. positiv (s. Tab. 7). Im Agar-Diffusionstest konnten jedoch bei diesen Proben keine Hemmhöfe nachgewiesen werden. Der Grund für diese unterschiedlichen Reaktionen könnte in einer mit dem Einfrieren und Auftauen der Proben verbundenen Verklumpung von Milchbestandteilen liegen (SCHWING, 1986), wobei es in den Partikeln zu einer Konzentrierung von Hemmstoffen gekommen sein könnte, während die ursprünglich gleichmäßig in der ganzen Probe gelösten Hemmstoffe im Agar-Diffusionstest unter der Nachweisgrenze lagen. Eine Wiederholung des Agar-Diffusionstests mit den im BRT positiven Proben fiel bei 6 Viertelgemelken ebenfalls positiv aus. Der Grund für diese Diskrepanz gegenüber dem ersten Ansatz im Agar-Diffusionstest könnte ebenfalls in der oben beschriebenen Klumpenbildung der Milch liegen, zumal auch die Hemmzonen relativ klein waren (1,4 bis 2,1 mm). Bei den verbleiben-

den 15 Milchproben, die im BRT positiv reagierten und bei denen sowohl vor als auch nach dem Einfrieren und Wiederauftauen der Proben im Agar-Diffusionstest keine Hemmstoffe nachzuweisen waren, muß es sich um falsch-positive Ergebnisse im BRT handeln, für die bisher eine Erklärung aussteht.

Über den 7. Tag p.p. hinaus wurden Stichproben entnommen, um auch Hemmstoffe zu erfassen, die aufgrund einer eventuellen unkontinuierlichen Ausscheidung - wie von MOL et al. (1970) und FEUERSTEIN (1987) beschrieben - am 6. und 7. Tag p.p. nicht nachweisbar waren. Aber auch bei diesen 95 Stichproben konnten keine Cloxacillin-Rückstände festgestellt werden.

Die Wartezeit des in diesem Versuch verwendeten Trockenstellers ist vom Hersteller mit 40 Tagen angegeben. Von den Versuchstieren waren nur drei kürzer als 6 Wochen, über die Hälfte jedoch länger als 8 Wochen trockengestellt (s. Tab. 1). Am 6. Tag p.p. war nur bei einem Tier, dessen Trockenperiode nur 32 Tage dauerte, die angegebene Wartezeit des Präparates noch nicht abgelaufen. Aber auch in der Milch dieses Tieres konnten keine Cloxacillin-Rückstände nachgewiesen werden.

Die Aussage dieser Arbeit, daß nach Ablauf der Wartezeit kein Cloxacillin in der Milch nachgewiesen wurde, stimmt mit den Ergebnissen von HILL und KEEFE (1974) überein, die in der Milch von mit Benzathin-Cloxacillin (500 mg) trockengestellten Kühen p.p. keine Hemmstoffe in der Konsummilch feststellen konnten. Bei Untersuchungen von OLIVER et al. (1984) mit verschiedenen Trockenstellern - u.a. Cloxacillin - konnten hitzestabile Hemmstoffe nicht einmal in der Kolostralmilch gefunden werden. Offensichtlich traten positive Befunde nur bei HILL und SMALL (1985) auf, die bei drei von zehn Vierteln, die mit Cloxacillin (500 mg) trockengestellt worden waren, nach Trockenperioden von 8 bis 12 Wochen noch Antibiotikarückstände im Kolostrum fanden.

Die Nachweisgrenze betrug sowohl im Agar-Diffusionstest als auch im BRT 0,03 µg/ml. Damit wurde zwar die vom BGA (1984) angegebene Nachweisgrenze für Cloxacillin von 10 µg/kg (0,01 µg/ml) nicht erreicht, allerdings lagen auch bei GEDEK und TERPLAN (1974) die Erfassungsgrenzen im Agar-Diffusionstest für Cloxacillin in der Milch bei 0,03 µg/ml. GEDEK (1984) gibt für den in

Bayern verwendeten BRT sogar nur 0,05 mg/l für Cloxacillin als Nachweisgrenze an.

Neben den Hemmstoffuntersuchungen wurde auch die Effizienz des Trockenstellers gegenüber euterpathogenen Keimen geprüft. Dazu wurden sowohl vor dem Trockenstellen als auch p.p. zytologische und bakteriologische Untersuchungen der Milch vorgenommen.

Der Anteil der CMT-positiven Tiere, die auf mindestens einem Viertel positiv (+/- bis +++) reagierten, lag bei 50,4 %. Der Prozentsatz der 520 Viertelgemelksproben war mit 23,5 % relativ niedrig, verglichen mit den Ergebnissen von FEUERSTEIN (1987), deren Anteil CMT-positiver Proben mit 66,9 % hoch liegt. Bei weiterer mikroskopischer Prüfung (Kieler Ausstrichverfahren) verringerte sich der Anteil sogar auf 14,6 %. Die Differenz könnte man den schon von OBIGER (1961; 1962) erwähnten "falsch-positiven" Reaktionen des CMT zuschreiben. Im Kieler Ausstrich stark erhöhter Zellgehalt war immer mit dem Vorhandensein von Granulozyten verbunden. Dies läßt auf Euterentzündungen schließen, zumal auch teilweise Phagozytose beobachtet werden konnte. Das Auffinden von euterpathogenen Keimen war zu 75 % mit erhöhtem Zellgehalt verbunden. Nur bei 13 Viertelgemelksproben (25 %) konnten mehr als 5 Kolonien pro Ausstrich auch ohne zytologischpositiven Befund isoliert werden (s. Tab. 11). In diesen Fällen könnte es sich um latente Infektionen gehandelt haben. Vor dem Trockenstellen fielen besonders sonstige Micrococcaceae (32,7 %) und gramnegative Keime (23,1 %) auf. Bemerkenswert ist auch das Auftreten von *Sc. agalactiae*, der viermal ohne Zellzahlerhöhung isoliert wurde. Bei den drei Tieren, die positive bakteriologische Befunde auf mehr als einem Viertel aufwiesen, wurden in diesem jeweils die gleichen Keime festgestellt.

Bezüglich der Effizienz des Trockenstellers zeigte sich nur teilweise eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren. WALSER et al. (1973), DAN-NEMANN (1973) und DAVIS et al. (1975) weisen auf die gute Wirkung von Cloxacillin auf *S. aureus* und Streptokokken hin. In den eigenen Untersuchungen wurde kaum eine Einwirkung auf die Keimbesiedelung mit *S. aureus* festgestellt, wenn man allein die Häufigkeit der bakteriologischen Befunde dieser Keime vor dem Trockenstellen und p.p. vergleicht (s. Tab. 13). Bei Betrachtung der

einzelnen Viertel jedoch zeigt sich, daß es zur Eliminierung von sieben *S. aureus*-Besiedelungen des Euters kam, wobei bei sechs sogar der Zellgehalt erhöht oder stark erhöht gewesen ist (s. Tab. 16). Eine durch *S. aureus* verursachte klinische Erkrankung vor dem Trockenstellen wurde durch die Applikation des Trockenstellers ausgeheilt. Es entstanden allerdings vier *S. aureus*-Besiedelungen von Eutervierteln neu, und zweimal wurde *S. aureus* sowohl vor dem Trockenstellen als auch p.p. isoliert. Das Präparat wirkte hervorragend gegen Streptokokken. Es kam zur Heilung sämtlicher, mit Streptokokken infizierten Viertel, vor allem, wie auch bei LANGLEY et al. (1971), der Galterkrankungen, die noch immer ein großes Problem für Milchviehbestände darstellen. Nach NEUNDORF (1960) treten Streptokokkeninfektionen besonders im Frühjahr auf. In diese Zeit fielen auch bei dieser Arbeit die meisten Abkalbungen. Trotzdem wurden nach dem Kalben kein einziges Mal Streptokokken in den Eutervierteln nachgewiesen. Die meisten Autoren berichten ebenfalls von besseren Erfolgen des Cloxacillins gegenüber Streptokokken als gegen Staphylokokken (LOOSMORE et al., 1968; CLEGG et al., 1975; DAVIS et al., 1975; KEEFE, 1980). Bei den gramnegativen Keimen kam es in sieben Fällen zur Ausheilung der Euteraffektionen, die zuvor sogar mit erhöhtem bzw. stark erhöhtem Zellgehalt verbunden waren, allerdings hatte sich insgesamt p.p. die Anzahl der gramnegativen Keimbefunde fast verdoppelt. 16mal konnten diese Keime in Vierteln p.p. isoliert werden, in denen sie vor dem Trockenstellen nicht nachweisbar waren. Zwar kam es zur Ausheilung einer durch gramnegative Keime verursachten Mastitis, aber p.p. wurde auch eine schwere Euterentzündung mit Sepsis durch gramnegative Keime hervorgerufen. Die Aussage, daß Neuinfektionen gramnegativer Keime durch Cloxacillin nicht verhindert werden können, entspricht der Meinung von KEEFE (1980) und SMITH et al. (1984a), die Trockensteller als unwirksam bzw. fast unwirksam gegen gramnegative Erreger bezeichnen. Ein gehäuftes Auftreten von coliformen Keimen nach der Geburt wurde schon von AEHNELT und KRAUSE (1955), GRUNERT und WEIGT (1964) und MAYER (1970) beschrieben. Nach NEUNDORF (1960) treten Colimastitiden im Frühjahr und im Herbst auf. Auch in diesen Untersuchungen wurden gramnegative Keime (> 5 Kolonien/Ausstrich) zu 75 % bei Geburten im Frühjahr nachgewiesen. MAYER (1970) weist auf den Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Colimastitiden und einer plötzlichen Futterumstellung auf Grünfutter hin, die zu Colimastitiden prädisponierenden enteralen Störungen führen kann.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen dennoch, daß der Trockensteller klinische Mastitiden auszuheilen vermochte. Die Neuinfektionsrate der Euterviertel, die vor dem Trockenstellen keinen bakteriologischen Befund aufwiesen, war mit 4,8 % p.p. relativ niedrig. Eine Senkung der Neuinfektionsrate durch das Trockenstellen mit Cloxacillin wurde auch von LOOSMORE et al. (1968), MERCK und RAACK (1972), HILL und KEEFE (1974) und KEEFE (1980) beobachtet.

Da der Schwerpunkt der Arbeit auf die Ermittlung von Rückständen nach dem Trockenstellen lag und die Versuchsgruppe möglichst groß gehalten werden sollte, wurden in die Untersuchungen keine unbehandelten Tiere, als Kontrollgruppe, einbezogen. Daher ist eine Aussage darüber nicht möglich, ob und gegebenenfalls wie hoch die Selbstheilungsrate infizierter Euterviertel unter den gleichen Bedingungen gewesen wäre. Es ist aber anzunehmen, daß sich auch bei einem Vergleich mit einer Kontrollgruppe der Erfolg des Trockenstellers ergeben hätte, wie dies von anderen Autoren in Vergleichen zwischen Cloxacillin-trockengestellten und unbehandelten Tieren nachgewiesen wurde (SMITH et al., 1967; MERCK und RAACK, 1972; HILL und KEEFE, 1974; BRANDER et al., 1975).

5 ZUSAMMENFASSUNG

An 154 mit einem Cloxacillin-Präparat trockengestellten Kühen wurde geprüft, ob in der Milch nach Ablauf der angegebenen Wartezeit noch Rückstände vorhanden sind und wie die Wirksamkeit des Arzneimittels bewertet werden kann. Als Testsysteme für Cloxacillin-Rückstände wurden der Agar-Diffusionstest (Blättchentest) und der Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT), jeweils mit *B.stearothermophilus var.calidolactis* (C 953) als Testkeim, verwendet (Nachweisgrenze beider Verfahren: 0,03 µg/ml Milch).

Vor dem Trockenstellen waren 38,2 % der Viertelgemelksproben im Agar-Diffusionstest hemmstoffpositiv, wobei es sich bei ca. 80 % um hitzelabile Hemmstoffe handelte (Inaktivierung bei 80 °C 10 Minuten).

Am 6. und 7. Tag nach dem Kalben (p.p.) konnten sowohl im Agar-Diffusionstest als auch im BRT bei Viertel- und Gesamtgemelksproben keine Cloxacillin-Rückstände gefunden werden. Bei fünf Proben, die im Agar-Diffusionstest auch nach Erhitzen Hemmzonen bis zu 2,0 mm zeigten, konnte durch Penicillinasezugabe Cloxacillin ebenso wie in 21 BRT-positiven Proben ausgeschlossen werden. Tiefgefrorene, wieder aufgetaute Milchproben können schwache positive Hemmstoffreaktionen hervorrufen, deren Ursache nicht geklärt werden konnte.

Durch zytologische und bakteriologische Untersuchungen der Milch wurde die Eutergesundheit vor dem Trockenstellen festgestellt und mit bakteriologischen Untersuchungsergebnissen vom 6. Tag p.p. verglichen. Die Anzahl der bakteriologisch positiven Befunde war p.p. um etwa 30 % zurückgegangen, wobei es zur Ausheilung von drei klinischen Mastitiden kam. Die Heilungsquote bei *Sc.agalactiae*- und anderen Streptokokken-Infektionen betrug 100 %. Während sich das Vorkommen von *S.aureus* nicht wesentlich verringerte, wurden sonstige Micrococcaceae stark reduziert. Bei gramnegativen Keimen kam es p.p. fast zu einer Verdoppelung der Befunde.

SUMMARY

Investigations about elimination and effectiveness after drying off cows with a Cloxacillin preparation

In 154 cows dried off with a Cloxacillin preparation it was examined, whether there are Cloxacillin-residues in the milk after the expiration of the with-holding time. For the detection of these residues the agar-diffusion-test (disk assay) and the Brilliantblack-reductiontest (BRT) were used, each with *B.stearothermophilus* var.*calidolactis* (C 953) as testorganism (limit of detection of both tests: 0.03 µg/ml milk).

Before drying off 38.2 % of the quarter-milk samples were positive in the agar-diffusion-test; about 80 % of them contained thermolabile inhibitors (inactivation at 80 °C for 10 minutes).

On the 6th and 7th day after calving (p.p. no residues which could be attributed to Cloxacillin were found in the quarter milk samples and in the bulk milk. Cloxacillin could be excluded by addition of penicillinase in five samples (agar-diffusion-test) and 21 samples (BRT) respectively, which were still positive after heating. Frozen, and thawed milksamples may provoke positive inhibitory reactions, the cause of which could not be cleared.

In cytobacteriological tests of the milk the udderhealth was evaluated before drying off and compared with the bacteriological results of the 6th day p.p. Bacteriologically positive results could be reduced by about 30 %, three cases of clinical mastitis were cured. 100 % of *Scagalactiae*- and other streptococcal infections could be treated successfully. The occurrence of *S.aureus* didn't decrease considerably, whereas the other micrococcaceae could be reduced to a large extent. Quarter milk samples with gramnegative microorganisms nearly doubled.

6 LITERATURVERZEICHNIS

AEHNELT, E. und D. KRAUSE (1955):

Zur Colimastitis beim Rind.

Dtsch. tierärztl. Wschr. 62, 211-216

ARRET, B., D.P. JOHNSON und A. KIRSHBAUM (1971):

Outline of details for microbiological assay of antibiotics: Second revision.

J. Pharm. Sci. 60, 1689-1694

ASHTON, D.H. und F.F. BUSTA (1968):

Milk components inhibitory to *Bacillus stearothermophilus*.

J. Dairy Sci. 51, 842-847

BAKKEN, G. (1985):

Zur Bedeutung der Haltung und anderer Umweltfaktoren für das Auftreten von Mastitiden.

Kieler Milchw. Forschungsber. 37, 440-446

BATISH, V.K., H. CHANDER, K.C. ZUMDEGNI, R.S. SINGH und K.L. BHATIA (1984):

Inhibition activity of lactoferrin against toxogenic *S. aureus*.

Arch. Lebensmittelhyg. 35, 9-11

BRANDER, G.C., J.H. WATKINS und R.P. GARD (1975):

A large scale mastitis control programme in Somerset.

Vet. Rec. 97, 300-304

BRANDER, G.C., A. JONES, F.K. NEAVE, F.H. DODD, R.G. KINGWILL und D.R. WESTGARTH (1964):

Antibiotics in slow and quick release-bases.

Vet. Rec. 76, 329-330

BRANDL, E. (1973):

Zum Problem von Fremdstoffrückständen in Milch und Milchprodukten.

Wien. tierärztl. Mschr. 60, 305-312

BRUMMER, H.P. (1969):

Antibiotikaaanwendung am Euter in Prophylaxe und Therapie.
Prakt. Tierarzt 50, 265-266

BRUNN, H.-J. (1971):

Untersuchungen über die Anwendung einiger Nachweismethoden zur Fest-
stellung von Antibiotika in Milch.
Diss. med. vet. Gießen

BUNDESGESUNDHEITSAMT (BGA) (1980):

Nachweis von Hemmstoffen in der Milch (Referenzverfahren).
Amtl. Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Band I/1,
L 01.00-6
Beuth Verlag, Berlin-Köln

BUNDESGESUNDHEITSAMT (BGA) (1982):

Nachweis von Hemmstoffen in der Milch (Brillantschwarz-Reduktionstest).
Amtl. Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Band I/1,
L 01.00-11
Beuth Verlag, Berlin-Köln

BUNDESGESUNDHEITSAMT (BGA) (1984):

Nachweis von Hemmstoffen in der Milch (Routineverfahren).
Amtl. Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG,
Band I/1 L 01.00-18
Beuth Verlag, Berlin-Köln

BUNDESGESUNDHEITSAMT (BGA) (1984):

Erste Bekanntmachung über Nachweisgrenzen und Fristen zum Einreichen von
Unterlagen über Rückstandsnachweisverfahren und Kontrollmethoden für
Tierarzneimittel.
Bundesanzeiger Nr. 242 v. 28.12.1984, S. 14137-14138

CHANDAN, R.C., K.M. SHAHANI und R.G. HOLLY (1964):

Lysozyme content in human milk.
Nature 204, 76-77

CHRISTIE, R., N.E. ATKINS und E. MUNCH-PETERSEN (1944):

A note on a lytic phenomenon shown by group B-streptococci.
Austr.J.exp. Biol. med. Sci. 22, 197-200

CHRISTIE, G.J., T.J. KEEFE und P.W. STROM (1974):

Cloxacillin and the dry cow.
Vet.Med.Small Anim. Clin. 69, 1403-1408

CLEGG, F.G., G.J. HALLDAY und H. HARDIE (1975):

Dry cow therapy: a comparative field trial using Benzathine-Cloxacillin
and Erythromycin.
Br.Vet.J. 131, 639-642

DANNEMANN, R. (1973):

Versuche zur Verbesserung der Eutergesundheit durch Trockenstellen von
Milchkühen mit Benzathin-Oxacillin und Benzathin-Cloxacillin.
Diss. med. vet. München

DAVIS, W.T., D.C. MAPLESDEN, R.P. NATZKE, W.N. PHILPOT, P. GARRETT
und C.S. CARD (1975):

Benzathin Cloxacillin. Intramammary infusion for treatment of mastitis in
dry cow.
Vet.Med.Small Anim.Clin. 70, 287-289

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (DIN) (1981):

Nachweis von Hemmstoffen in der Milch (Referenzverfahren). DIN 10 182,
Teil 1
Beuth Verlag, Berlin-Köln

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (DIN) (1982):

Nachweis von Hemmstoffen in der Milch (Brillantschwarz-Reduktionstest).
DIN 10 182, Teil 2
Beuth Verlag, Berlin-Köln

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (DIN) (1983):

Nachweis von Hemmstoffen in der Milch (Routineverfahren).
DIN 10 182, Teil 3
Beuth Verlag, Berlin-Köln

DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT (DVG) (1980):

Die subklinische Mastitis des Rindes und Vorschläge für bundeseinheitliche Richtlinien zu ihrer Bekämpfung.

Fachgruppe Milchhygiene des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Kiel

DITTUS, G., H. FRIEDING und K. WALSER (1972):

Untersuchungen zur Behandlung subklinischer Mastitiden des Rindes mit Isoxazolyl-Penicillinen in der Trockenperiode. I. Mitteilung: Die Antibiotika-Empfindlichkeit euterpathogener Staphylokokken und Streptokokken, unter Berücksichtigung der Isoxazolyl-Penicilline.

Berl. Mchn. tierärztl. Wschr. 21, 406-409

DODD, F.H., D.R. WESTGARTH und T.K. GRIFFIN (1977):

Strategy of mastitis control.

J. Am. Vet. Assoc. 170, 1124-1128

EBENDORFF, W., K. KRAM, K. HARTMANN, U. MÖRCHEN und J. DÖRGE (1985):

Untersuchungen zum Einfluß auf Milchleistung und Eutergesundheit bei Unterlassen des Nachmelkens. Auswirkungen in der 3. Laktation.

Mh. Vet. Med. 40, 116-118

EDMONDS, M.J. (1979):

The prevention of summer mastitis in dry cows by intramammary infusions of Ampicillin and Cloxacillin.

Vet. Rec. 104, 554-555

EDWARDS, S.J. und G.S. SMITH (1967):

The effect of treatment of the dry cow on the occurrence of clinical mastitis.

Vet. Rec. 80, 486-487

EVANS, J.M., A.M. HARRIS, M.J. MARSHALL und K.E. PUGH (1972):

Dry cow therapy.

Vet. Rec. 90, 542-543

FEUERSTEIN, A. (1987):

Untersuchungen zu Ausscheidungsdauer und Wirksamkeit nach dem Trockenstellen von Kühen mit einem Oxacillinpräparat.

Diss. med. vet. München

FORSCHNER, E. (1973):

Störmöglichkeiten in biologischen Hemmstoffnachweissystemen durch Keimbelastung des Untersuchungsmaterials. Eine Studie aufgrund praktischer Erfahrungen mit Hemmstoffnachweisverfahren bei Milch.

Arch. Lebensmittelhyg. 24, 159-162

FRANK, H.K. (1969):

Milcheigene Faktoren, die das Wachstum von Joghurt-Bakterien beeinflussen können.

Milchwiss. 24, 269-277

FRANK, W. (1981):

Der somatische Zellgehalt der Milch.

Milchpraxis 19, 102-104

FRANK, N.A. und W.D. POUNDEN (1961):

Prevalence of bovine mastitis.

J. Am. Vet. Assoc. 138, 184

FUNK, D.A., A.E. FREEMAN und P.J. BERGER (1982):

Environmental and physiological factors affecting mastitis at drying off and postcalving.

J. Dairy Sci. 65, 1258-1268

GALTON, D.M., L.G. PETERSSON, W.G. MERRILL, D.K. BRANDLER und D.E. SCHUSTER (1984):

Effects of premilking preparation on bacterial population, sediment and iodine residue in milk.

J. Dairy Sci. 67, 2580-2589

GEDEK, W. (1984):

Hemmstoffe in der Milch: Alte und neue Fragen.

Dtsch. Molkerei-Ztg. 105, 1779-1787

GEDEK, W. und C. BAATH (1976):

Erfassung Penicillinase-fester Penicilline in Milch durch Penicillin-Beta-Lactamase.

Arch. Lebensmittelhyg. 27, 170-172

GEDEK, W. und G. TERPLAN (1974):

Blutspiegel- und Harnspiegel-Zeit-Kurven von Isoxazolyl-Penicillinen nach intrazisternaler Verabreichung beim Rind.

Arch. Lebensmittelhyg. 25, 271-273

GOUDSWAARD, J., E.G. BAKKER-DE KOOF und H.P.M. VAN RAVENSWAAIJKRAAN (1978):

Lysozyme and its presence in bovine milk and serum.

Tijdschr. Diergeneesk. 103, 445-450

GREGERSEN, T. (1978):

Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacterial.

Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 5, 123-127

GRUNERT, E. und U. WEIGT (1964):

Beitrag zur Klebsiellen-Mastitis beim Rind.

Berl. Mchn. tierärztl. Wschr. 77, 116-120

GUDDING, R. (1976):

An improved bacteriological method for the detection of sulfonamide residues in food.

Acta Vet. Scand. 17, 458-464

HAMANN, J. (1975):

Euterentzündung, nach wie vor Schadensfaktor Nr.1 in der Milchviehhaltung.

Eine Bilanz bisheriger hygienischer Bemühungen.

Tierzüchter 6, 237-241

DERSELBE (1980):

Melktechnik und Hygiene, Prävention der subklinischen Mastitis.
Milchpraxis 18, 78-83

HARMON, R.J. und F.H.S. NEWBOULD (1980):

Neutrophil leucocyte as a source of lactoferrin in bovine milk.
Am.J. Vet. Res. 41, 1603-1606

HEINERT, H.H., G. van der WALL und H. BREHMER (1976):

Lysozym - Ursache von unspezifischen Reaktionen im mikrobiologischen
Hemmstofftest.
Arch. Lebensmittelhyg. 27, 55-60

HILL, B.M. und J.M. SMALL (1985):

Antibiotic residue release at beginning of lactation following dry cow
therapy.
N.Z.Vet. J. 33, 105-107

HILL, G.N. und T.J. KEEFE (1974):

Efficacy of Benzathin-Cloxacillin in dry cow mastitis treatment.
Mod. vet. Pract. 5, 843-846

HIRSCH, H.-P. (1983):

Zur Sicherung der Eutergesundheit von Kühen in der Trockenperiode.
Mh. Vet. Med. 38, 869-976

DERSELBE (1985):

Zur Antibiotikabehandlung trockenstehender Kühe in galfreien Milchvieh-
anlagen.
Mh. Vet. Med. 40, 224-227

JACOBS, J., M. KLASSENS und A. PENNINGES (1972):

Een onderzoek naar de eigenschappen van twee zogenaemde "droogzetpre-
paraten".
Tijdschr. Diergeneesk. 97, 466-476

KALICH, J. (1958):

Die Colimastitis des Rindes.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 58, 198-205

KEEFE, T.J. (1980):

Benzathine-Cloxacillin as a dry cow mastitis product.
Mod. vet. Pract. 61, 783-785

KELLERMANN, R. und B. WAUSCHKUHN (1968):

Nachweis von Hemmstoffen in der Anlieferungsmilch.
Molkerei-Ztg. 22, 839-843

KIELWEIN, G. (1985):

Leitfaden der Milchkunde und Milchhygiene.
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 2. Aufl., p. 28-31

KLIMA, H. (1966):

Zur Frage des Hemmstoffnachweises anlässlich der bakteriologischen Fleisch-
untersuchung.
Fleischwirtschaft 46, 1347-1349

KORHONEN, H. (1981):

zit. n. REITER, B. (1983): In: Resistance factors and genetic aspects of
mastitis control, edited by L. Bassalik-Chabielska, pp. 421-440

KOSIKOWSKI, F.V. (1963):

Induced and natural inhibitory behavior of milk and significance to anti-
biotic disc assay testing.
J. Dairy Sci. 46, 95-101

KOSIKOWSKI, F.V. und M. O'LEARY (1963):

Natural inhibitory characteristics of some Irish manufacturing milks.
J. Dairy Sci. 46, 89-94

KRAACK, J. und J. REICHMUTH (1971):

Zum Nachweis von Hemmstoffen in Milch mit dem Brillantschwarz-Reduk-
tionstest. II. Teil: Zur Hemmwirkung weiterer Substanzen auf das Wachstum
vom *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis*.
Arch. Lebensmittelhyg. 22, 82-86

KRAACK, J. und A. TOLLE (1969):

Zum Nachweis von Hemmstoffen in Milch mit dem Brillantschwarz-Reduktionstest. I. Teil: Verbesserte Methodik.

Arch. Lebensmittelhyg. 20, 145-149

LANGLEY, O.H., W.J. MEANEY, N.P. CULLEN und J.F. CUNNINGHAM (1971):

The control of mastitis.

Vet. Rec. 89, 315-316

LAUERMANN, G., H. MROZEK, K. SCHARF und S. SCHOLZ (1981):

Können Reinigungsmittel in Melkanlagen zu positiven Hemmstoffwerten in der Milch führen?

Milchpraxis 19, 152-153

LAW, B.A. und B. REITER (1977):

The isolation and bacteriostatic properties of lactoferrin from bovine milk whey.

J. Dairy Res. 44, 595-599

LIMMER, H.-D. (1969):

Hemmstoffe in der Milch.

Arch. Lebensmittelhyg. 20, 227-231

LOOSMORE, R.M., D. HOWELL, A.D. ADAM, D.N. BARNETT und T.F.F. BARR (1968):

Drying off therapy for bovine mastitis: A comparative field trial.

Vet. Rec. 83, 358-360

LUPKE, H. (1972):

Hemmstoffuntersuchungen in Rohmilch im Hinblick auf Qualitätsbewertung und -bezahlung.

Dtsch. Molkerei-Ztg. 93, 1421-1430

MACMILLAN, K.L., G.F. DUIRS und D.M. DUGANZICH (1983):

Associations between dry cow therapy, clinical mastitis, and somatic cell count score with milk and fat production in ten New Zealand dairy herds.

J. Dairy Sci. 66, 259-263

MALHOTRA, B.P., M.P. KAPUR, J.L. BHUTANI (1984):

Matitis control with benzathine cloxacillin in dry-cows.

ref. in: Dairy Sci. Abstr. 46, Nr. 1382, p. 159

MAYER, J. (1970):

Erhebungen über akute Mastitiden des Rindes in einem niederbayerischen Praxisbereich.

Diss. med. vet. München

MERCK, C.C. und R. DANNEMANN (1977):

Zum medikamentellen Trockenstellen der Milchkühe mit Benzathin-Cloxacillin. II. Mitteilung.

Berl. Mchn. tierärztl. Wschr. 90, 25-28

MERCK, C.C. und C. RAACK (1972):

Vorläufige Mitteilung über die Behandlungsergebnisse eutergesunder und subklinisch eutererkrankter Kühe mit "Orbenin"-BEECHAM R.L. in der Trockenphase.

Tierärztl. Umschau 72, 420-426

MERCK, C.C., R. DANNEMANN und U.-E. PFLEIDERER (1977):

Zum medikamentellen Trockenstellen der Milchkühe mit Benzathin-Cloxacillin. III. Mitteilung: Einfluß auf die Eutergesundheit der folgenden Laktationsperiode.

Berl. Mchn. tierärztl. Wschr. 90, 197-200 und 209-212

METHODENKOMMISSION (Deutsche Kommission zur Vereinheitlichung der Untersuchungsmethoden für Milch, Milchprodukte und Molkereihilfsstoffe) (1960):

Die mikrobiologischen Methoden für die Untersuchung von Milch und Milch-erzeugnissen.

Milchwiss. 15, 120-129

MICKELSON, M.N. und R.W. BROWN (1985):

Physiological characteristics of *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* and the effect of the lactoperoxidase complex on their growth in a chemically-defined medium and milk.

J. Dairy Sci. 68, 1095-1102

WILCH-ROEHRING BAYESEN (1967):

Beitrag zur Mastitis

WOL, H. (1968):

Het voorkomen van antibioticaresistentie in aan de zuivelfabriek afgeleverde koele melk.

Tijdschr. Diergeneesk. 93, 579-587

WOL, H., S. BRAND-SMID and E.J. BAKKER-DE KOOFF (1970):

Invloed van de duur der droogstandperiode op het voorkomen van antibioticaresistentie in de melk na behandeling met penicilline houdende preparaten met een lange verrijngstuur aan het begin der droogstandperiode.

Tijdschr. Diergeneesk. 95, 785-791

WAXLER, J., L. ALLI, W. LONG, D.W. BROWN, R. ACRED, G.N. ROLINSON, R.A. BATCHELOR, S. STEVENS and R. SUTHERLAND (1962):

Chemistry, toxicology, pharmacology, and microbiology of a new acid-stable penicillin, resistant to penicillinase.

Nature 195, 1264-1267

WATKINS, R.F., R.W. EVERETT, R.S. GUTHRIE, J.F. KEOWN, A.M. MEEK, W.G. MERRILL, S.L. ROBERTS and G.H. SCHMIDT (1972):

Mastitis control programs: Effect on milk production.

J.Dairy Sci. 55, 1256-1260

WEAVER, F.A., M.E. SHARPE and F.H.S. NEWBOULD (1962):

Experimental experimental mastitis.

National Institute for Research in Dairying, Report 76-78.

WEAVER, F.A., F.H. DODD, R.G. KINGWILL and D.R. WESTGARTH (1969):

Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management.

J.Dairy Sci. 52, 686-707

NEUMANN, H.J. (1968):

Bericht über das Mastitis-Symposium in Kiel 1962.

Tierärztl. Umschau 23, 131-135

NEUMANN, H.J., H. LUPKE, H.-J. KÜHN, W. PETERSEN und H. BILLMAYER (1971):

Modernisierung der tierärztlichen Milchüberwachung in Schleswig-Holstein.
Tierärztl. Umschau 26, 465-470

NEUNDORF, R. (1960):

Zur Prophylaxe und Therapie der Mastitis des Rindes.
Mh. Vet. Med. 65, 328-334

NONNECKE, B.J. und K.L. SMITH (1984a):

Biochemical and antibacterial properties of bovine mammary secretion during mammary involution and at parturition.
J. Dairy Sci. 67, 2863-2872

DIESELBEN (1984b):

Inhibition of mastitic bacteria by bovine milk Apo-Lactoferrin. Evaluated by in vitro microassay of bacterial growth.
J. Dairy Sci. 67, 606-613

NOUWS, J.F.M., T.B. VREE, H.J. BREUKING, M. BAAKMAN, F. DRIESSENS und A. SMULDERS (1985):

Dose dependent disposition of sulphadimidine and of its N₄-acetyl and hydroxy metabolites in plasma and milk of dairy cows.
Tijdschr. Diergeneesk. 110, 1015-1024

OBIGER, G. (1961):

Reichweite und Bedeutung der sogenannten Schnellmethode sowie weiterer Laboratoriumsuntersuchungen zur Feststellung von Euterentzündungen.
Kieler Milchw. Forschungsber. 13, 293-304

DERSELBE (1962):

Mastitisdiagnose.
Kieler Milchw. Forschungsber. 14, 307-325

DERSELBE (1963):

Hemmstoffe in der Anlieferungsmilch und Methoden zu ihrem Nachweis.
Arch. Lebensmittelhyg. 14, 10-19

DERSELBE (1970):

Das Problem der Fremd- und Wirkstoffe in Rohmilch sowie ihrer Ermittlung
- Betrachtung zum Hemmstoffnachweis mit dem Brillantschwarz-Reduktionstest.

Arch. Lebensmittelhyg. 21, 209-217

OLIVER, S.P., R.T. DUBY, R.W. PRANGE und J.P. TRITSCHLER (1984):

Residues in colostrum following antibiotic dry cow therapy.

J. Dairy Sci. 67, 3081-3084

PANKEY, J.W., R.J. EBERHART, A.L. CUMING, R.D. DAGGETT, R.J. FARNSWORTH und C.K. McDUFF (1984):

Uptake on postmilking teat dip antiseptics.

J. Dairy Sci. 67, 1336-1353

PEARSON, J.K.L. (1950):

The use of penicillin in the prevention of *C. pyogenes*-infection of the non-lacting udder.

Vet. Rec. 62, 166-168

PEARSON, J.K.L. und C.L. WRIGHT (1969):

Dry cow therapy as a mean of controlling bovine mastitis.

Vet. Rec. 84, 294-298

PHILPOT, W.N. (1969):

Role of therapy in mastitis control.

J. Dairy Sci. 52, 708-713

POSTLE, D.S. und R.P. NATZKE (1974):

Efficacy of antibiotic treatment in the bovine udder as determined from field studies.

Vet. Med. Small Anim. Clin. 69, 1535-1539

POUTREL, B., F. SERIEYS, C. LERONDELLE (1984):

Effect of a second treatment (ampicillin-cloxacillin) during the dry period on the level of mammary infection at calving.

ref. in: Dairy Sci. Abstr. 46, p. 626, Nr. 5508

PROBST, A. und J. BEHRINGER (1968):

Zur Frage prädisponierender Faktoren bei Mastitis. II. Mitteilung: Über den Zellgehalt der Milch in Abhängigkeit von Lebensalter, Leistung, Abkalbezeit und Laktationsstadium.

Milchwiss. 23, 395-399

REICHMUTH, J., H. ZEIDLER, A. TOLLE und W. HEESCHEN (1970):

Zum Einfluß subklinischer Mastitiden auf die Milchleistung des Rindes.

Berl. Mchn. tierärztl. Wschr. 83, 26-30

REITER, B. (1978a):

Review of the progress of dairy science: Antimicrobial systems in milk.

J. Dairy Res. 45, 131-147

DERSELBE (1978b):

Review of nonspecific antimicrobial factors in colostrum.

Ann. Rech. Vét. 9, 205-224

DERSELBE (1983):

the role of the non-antibody proteins in milk in the protection of the newborn.

Manuskript IMV-Gruppe F 19, Internationaler Milchwirtschaftsverband (IMV), 7. - 11. März, Brüssel

REITER, B. und J.D. ORAM (1967):

Bacterial inhibitors in milk and other biological fluids.

Nature 216, 328-330

REITER, B., V.M. MARSHALL und S.M. PHILIPPS (1980):

The antibiotic activity of the lactoperoxidase-thiocyanat-hydrogenperoxide system in the calf abomasum.

Res. Vet. Sci. 28, 116-122

SCHÄFER, B. (1966):

Zur Eignung Oberflächen-Tupfer-Kulturen für die Bestimmung des Keimgehaltes von Milch.

Diss. med. vet. Hannover

SCHALM, O.W. (1960):

Ein neuer Mastitistest.

Tierärztl. Umschau 15, 151-153

SCHANBACHER, F.L. und K.L. SMITH (1975):

Formation and role of unusual whey proteins and enzymes: Relation to mammary function.

J. Dairy Sci. 58, 1048-1062

SCHMAHLSTIEG, R. (1960):

Die Mastitis.

Dtsch. tierärztl. Wschr. 67, 104-107 und 159-163

SCHMID, G., P. MEYER, M. GARHAMMER und K. WALSER (1973):

Untersuchungen zur Behandlung subklinischer Mastitiden des Rindes mit Isoxazolyl-Penicillinen in der Trockenperiode. 3. Mitteilung: Die Verweildauer von Isoxazolyl-Penicillinen im trockenstehenden Euter der Kuh.

Berl. Mchn. tierärztl. Wschr. 85, 42-44

SCHULTZE, W.D. (1983):

Effects of a selective regimen of dry cow therapy on intramammary infection and on antibiotic sensitivity of surviving pathogens.

J. Dairy Sci. 66, 892-903

SCHWING, B. (1987):

Pers. Mitteilung.

SEELEMANN, M. (1928):

Technik und Methodik der Milchuntersuchung zwecks Feststellung von Sekretionsstörungen bzw. Eutererkrankungen.

Molkerei-Ztg. 42, 2809-2812 und 2826-2827

SEELEMANN, M. und G. OBIGER (1956):

CAMP-Test und TKT-Medium, ihre Bedeutung für die Galt diagnose und Galt bekämpfung.

Milchwiss. 11, 98-103 und 134-140

SEELEMAN, M., A. MEYER und J. KNOLLE (1962):

Zur Frage der praktischen Anwendung von Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen als Mittel zur Verhütung vermeidbarer Milch- und Euterinfektionen.

Kieler Milchw. Forschungsber. 14, 211-228

SMITH, K.L., H.R. CONRAD und R.M. PORTER (1971):

Lactoferrin and IgG immunoglobulins from involuted bovine mammary glands.

J. Dairy Sci. 54, 1427-1435

SMITH, K.L., D.A. TODHUNTER und P.S. SCHOENBERGER (1985a):

Environmental pathogens and intramammary infection during the dry period.

J. Dairy Sci. 68, 402-417

DIESELBEN (1985b):

Environmental mastitis: Cause, prevalence, prevention.

J. Dairy Sci. 68, 1531-1553

DIESELBEN (1985c):

Lactoferrin and defense of the involuted mammary gland against infections by environmental pathogens.

Kieler Milchw. Forschungsber. 37, 477-481

SMITH, A., F.K. NEAVE, F.H. DODD und G.C. BRANDER (1966):

Methods of reducing the incidence of udder infection in the dry cows.

Vet. Rec. 79, 233-235

SMITH, A., D.R. WESTGARTH, M.R. JONES, F.K. NEAVE, F.H. DODD und G.C. BRANDER (1967):

Methods of reducing the incidence of infection in dry cows.

Vet. Rec. 80, 504-510

STEFFAN, J., ST. CHAFFAUX, D. BALLOY und M. PRIKASKY (1984):

Prévention et guérison des infections mammaires durant la période de tarissement, comparaison de trois traitements.

Rec. Med. Vet. 160, 35-42

TERPLAN, G. (1969):

Bakteriologisch-hygienische Beurteilung von Sauermilcherzeugnissen.
Dtsch. Molkerei-Ztg. 90, 1996-2000

TERPLAN, G. und H.-H. GROVE (1977):

Zitzendesinfektion im Rahmen der Mastitisbekämpfung.
Prakt. Tierarzt 27, 718-721

TERPLAN, G. und H.-U. WIESNER (1969):

Weniger Euterschäden und bessere Milch durch sachkundige Handhabung
der Melkmaschine. Sonderdienst für alle Milchlieferanten (Merkblatt).
Mann-Verlag, Hildesheim

TERPLAN, G. und K.-J. ZAADHOF (1967):

Zum Vorkommen und Nachweis von Hemmstoffen in der Milch: Eine
kurze Übersicht.
Milchwiss. 22, 761-771

TERPLAN, G., K.-J. ZAADHOF und A. MATHEIS (1972):

Erhebungen über das Vorkommen von Antibiotika in der Anlieferungsmilch.
Arch. Lebensmittelhyg. 23, 29-34

TERPLAN, G., K.-J. ZAADHOF, H. ANGERSBACH und M. SKARLAKIDOU (1973):

Zur Abgrenzung unspezifischer Hemmungen von *B. stearothermophilus* var.
calidolactis beim Nachweis von Hemmstoffen in Lebensmitteln tierischen
Ursprungs (vorläufige Mitteilung).
Arch. Lebensmittelhyg. 24, 90-92

TOLLE, A. (1983):

Hygiene der Milch. in: GRAVERT, W.O.: Die Milch, p. 211-305
Ulmer Verlag, Stuttgart

TOLLE, A. und W.G. WHITTLESTONE (1976):

Grundlage der Hygiene der Milchgewinnung
Kieler Milchw. Forschungsber. 28, 81-228

TOLLE, A., W. HEESCHEN und J. HAMANN (1977):

Grundlage einer systematischen Bekämpfung der subklinischen Mastitis des Rindes.

Kieler Milchw. Forschungsber. 29, 3-103

TOLLE, A., H. ZEIDLER, W. HEESCHEN, J. KRAACK und J. REICHMUTH (1968):

Untersuchungen über somatische Zellen, saprophytäre Keime und antibiotisch wirksame Hemmstoffe in der Rohmilch aus 12 Einzugsgebieten der BRD.

Kieler Milchw. Forschungsber. 20, 343-394

UVAROV, O., J.M. EVANS, M. MARSHALL und D. SIZER (1967):

Dry cow therapy.

Vet. Rec. 81, 241-242

WALLNER, B. (1972):

Isoxazolyl-Penicillin-Rückstände in Konsummilch nach intramammärer Trockenzeittherapie beim Rind.

Diss. med. vet. München

WALSER, K. (1966):

Melkmaschine und Mastitis.

Verlag Paul Parey, Berlin-Hamburg

WALSER, K., H. FRIEDING und G. SCHMID (1973):

Untersuchungen zur Behandlung subklinischer Mastitiden des Rindes mit Isoxazolyl-Penicillinen in der Trockenperiode.

Berl. Mchn. tierärztl. Wschr. 86, 101-104

WEAVER, G.L. und M. KROGER (1978):

Lysozyme activity of high-leucozyte-count milk and the effect of heat and potassium dichromate on lysozyme activity.

J. Dairy Sci. 61, 1089-1092

WEIGT, U. (1974):

Systematische Bekämpfung der chronischen Mastitiden speziell beim Trockenstehen der Kühe.

Prakt. Tierarzt / Coll. Vet. 55, 56-59

WELTY, F.K., K.L. SMITH und F.L. SCHANBACHER (1976):

Lactoferrin concentration during involution of the bovine mammary gland.
J. Dairy Sci. 59, 224-231

WELZ, W. (1967):

Zur Frage einer möglichen Beeinflussung des Hemmstoffnachweises im Rahmen der bakteriologischen Fleischuntersuchung durch in Pflanzen vorkommende antibakterielle Wirkstoffe.
Arch. Lebensmittelhyg. 18, 230-231

WOLIN, A.G. und F.V. KOSIKOWSKI (1955):

Some characteristics of natural antibacterial properties of milk.
J. Dairy Sci. 38, p. 597

WRIGHT, C.L. und J.D. LEAVER (1984):

Effect of dry cow therapy on the incidence of mastitis infections in the dry period and early lactation.
ref. in: Dairy Sci. Abstr. 46, p. 273, Nr. 2359

ZEITRÄG, K.-H. (1970):

Zum biologischen Nachweis aus Futterpflanzen stammender Hemmstoffe in der Milch.
Diss. med. vet. Hannover

Abschließend möchte ich Herrn Prof. Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas und seine Anregungen zur Arbeit herzlich danken.

Frau Dr. R. Schoen danke ich für die Betreuung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Mein Dank gilt auch der Firma Virbac für die kostenlose Überlassung des Präparates sowie für die freundliche Unterstützung.

Allen Mitarbeitern des Instituts, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben, insbesondere Frau H. Schäffer für die stets gewährleistete Hilfsbereitschaft bei der Durchführung des Versuches und Frau M. Schmidt für die Unterstützung bei der Literatur, danke ich herzlich. Für das Schreiben der Arbeit bedanke ich mich bei Frau E. Spensberger.

LEBENS LAUF

Am 10.4.1961 wurde ich als fünftes Kind des Konsuls Karl Erh. Paulitschke und Albine Paulitschke-Groß in Wien geboren.

Von 1967 bis 1971 besuchte ich die Grundschule der Deutschen Schule Rom und die Volksschule Preßbaum (Niederösterreich). Zum Schuljahr 1971/72 wechselte ich ins Gymnasium der Dominikanerinnen nach Wien. Ab 1973 besuchte ich die Liebfrauenschule Bonn, wo ich im Mai 1980 die allgemeine Hochschulreife erwarb.

Im Herbst 1980 begann ich mit dem Tiermedizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München, das ich im November 1985 mit dem Staatsexamen abschloß.

Seit 6. Oktober 1984 bin ich mit Dr. Norbert Neumann, prakt. Tierarzt in Neumarkt St. Veit, verheiratet.

